

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**GUILHERME GRODZKI OLIVEIRA FIGUEIREDO**

**PROTOCOLO PARA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM  
SEMENTES DE CANA-DE-AÇÚCAR**



**CURITIBA**

**2012**

**GUILHERME GRODZKI OLIVEIRA FIGUEIREDO**

**PROTOCOLO PARA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM  
SEMENTES DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Bessalho Filho

**CURITIBA**

**2012**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL



## PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pelo candidato **GUILHERME GRODZKI OLIVEIRA FIGUEIREDO**, sob o título "**PROTOCOLO PARA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM SEMENTES DE CANA-DE-AÇÚCAR**", para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido o candidato são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação.

Curitiba, 02 de Março de 2012.

Professora Dra. Louise Larissa May De Mio  
Coordenadora do Programa

Professor Dr. Marcos Antonio Sanches Vieira  
Primeiro Examinador

Professor Dr. Ricardo Augusto de Oliveira  
Segundo Examinador

Professor Dr. João Carlos Bessalho Filho  
Presidente da Banca e Orientador

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus pelo seu amor demonstrado na cruz do calvário por toda a humanidade. Sem ELE tudo seria em vão.

À minha mãe pela dedicação na minha criação, me ajudando nos momentos mais difíceis e investindo na minha educação.

Ao meu pai por me instruir e sempre me apoiar.

Ao meu tio Leocádio que serviu de inspiração na minha carreira profissional.

À Rebecca minha companheira e auxiliadora.

Ao Prof. Dr. João Carlos Bespalhok Filho pela orientação, amizade, paciência e ensinamentos passados desde o período da graduação em Agronomia.

Ao Prof. Paulo de Tarso pelo apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Ricardo Augusto de Oliveira pelas contribuições.

Aos colegas e professores do Programa de Pós-Graduação, em especial a colega Valéria R. Lopes, que teve um papel importante no desenvolvimento da dissertação.

À Maria Emilia Kudla, pelo apoio e exemplo de dedicação.

Aos estagiários Osni Roberto e Algione Petenusso do curso de Agronomia, que sempre se prontificaram a ajudar nos experimentos deste trabalho.

À RIDESA, à EMBRAPA Agrobiologia e ao Departamento de Bioquímica da UFPR, pelo fornecimento do material necessário para o desenvolvimento do projeto.

Ao REUNI pela bolsa concedida.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram na realização da dissertação.

*“Cada progresso que a humanidade alcançou aconteceu porque alguém imaginou como as coisas poderiam ser e não mais se satisfez com a forma como elas eram”*

*Jim Cymbala*

## RESUMO

A cana-de-açúcar tem uma grande importância no Brasil, pela produção do etanol e do açúcar, ambos com grande demanda no mercado interno. Para um acréscimo na produção da cultura, muitas vezes se faz necessário o uso em larga escala de adubos químicos, principalmente os nitrogenados. No entanto, o manejo inadequado do nitrogênio, pode poluir solos e rios. Uma das alternativas para reduzir esse impacto são as bactérias diazotróficas, as quais fornecem o nitrogênio e também promovem o crescimento de plantas através de reguladores vegetais. No desenvolvimento das cultivares de cana-de-açúcar, o melhoramento genético direciona os cruzamentos de interesse. No entanto, as progênies ainda não são submetidas a testes com bactérias diazotróficas, se fazendo necessários testes preliminares nesse sentido. O presente trabalho teve por objetivo desenvolver um protocolo para a inoculação de bactérias diazotróficas em sementes de cana-de-açúcar. Inicialmente o trabalho foi desenvolvido em seis etapas, determinando-se a densidade de semeadura, substrato mais adequado na germinação de plântulas, como aplicar os inoculantes diazotróficos e qual inoculante mais adequado. Depois diferentes famílias foram submetidas ao modelo do protocolo, buscando avaliar a responsividade à inoculação. Os parâmetros estimados no decorrer dos experimentos foram índice de velocidade de germinação (IVG), número de plântulas germinadas, crescimento da população, tamanho de plântulas e raízes e o teor de clorofila. Os experimentos foram submetidos a ambientes controlados em delineamento experimental inteiramente casualizado, com o teste de Tukey para comparação de médias a 0,05 de probabilidade. O protocolo ficou definido com uma densidade de 150 mg de espiguetas de cana-de-açúcar, dentre os substratos testados, o substrato comercial Plantmax® foi o que apresentou melhores condições no desenvolvimento de plântulas e na interação com os inoculantes e ficou recomendada a dose de 1,6% de inoculante turfoso do mix da Embrapa. As famílias 35 (RB971747xRB805013), 479A (RB931611xRB99386), 538A (RB865152xRB92579) e 589 (RB845231XH64-1881) foram responsivas ao inoculante da Embrapa, para pelo menos um dos parâmetros estudados. Outros testes ainda são necessários para verificar a responsividade em outras famílias de cana-de-açúcar.

**Palavras-chave:** *Saccharum* spp., espiguetas, *Azospirillum brasilense*, inoculante, nitrogênio.

## ABSTRACT

The sugarcane has a great importance in Brazil, mainly because of the production of ethanol and sugar, both with increased demands in the domestic market. For an addition in the production of the culture, it is necessary the use of fertilizers in large scale. One of the most important is the nitrogen fertilizers, however an inadequate handling of nitrogen can contaminate soil and rivers. An alternative to reduce the impact are the diazotrophic bacteria, they can supply nitrogen and also promote the growth of plants through production of plant regulators. In the development of genotypes, the breeding programs realize interest crossings. However, the clones are not yet submitted to the tests with diazotrophic bacteria, being necessary preliminary tests. The objective of this project was to develop a protocol for the inoculation of diazotrophic bacteria in sugarcane seeds. Initially the work was developed in six stages, to determinate density of sowing, to adjust the better substrate to the germination of seedlings, how to apply the inoculation with diazotrophic bacteria and which inoculate is more adequate. Later the families had been submitted to the model protocol, looking for the responsible families to the inoculation. The parameters evaluated in the experiments were: speed of germination index (SGI), number of seedlings germinated, size of the growth population, size of seedlings and roots, and content of chlorophyll. A completely randomized design was used. The averages were compared by the Tukey test ( $= 0.05$ ). The protocol was: (1) density of 150 mg of spikes of sugarcane; (2) the commercial substrate Plantmax® had the better conditions in the development of seedlings and the interaction with inoculation; (3) 1.6% of peat inoculant of the Embrapa 'mix'. The families 35 (RB971747xRB805013), 479A (RB931611xRB99386), 538A (RB865152xRB92579) and 589 (RB845231XH64-1881) were responsive to the inoculant of the Embrapa, at least one of the parameters studied. Other tests are still necessary to verify the responsivity in other families of sugarcane.

**Key-words:** *Saccharum* spp., spikes, *Azospirillum brasilense*, inoculant, nitrogen.

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS, CLASSIFICAÇÃO, LOCAL DE ISOLAMENTO E OS BENEFÍCIOS ENVOLVIDOS NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL.....	28
TABELA 2	CRUZAMENTOS (FAMÍLIAS) UTILIZADOS, ANO DO CRUZAMENTO E TIPO DE CRUZAMENTO.....	41
TABELA 3	MÉDIA GERAL DA GERMINAÇÃO DE PLÂNTULAS EM 500 mg DE ESPIGUETAS NAS DIFERENTES FAMÍLIAS DE CANA-DE-AÇÚCAR 15 DIAS APÓS A SEMEADURA.....	45
TABELA 4	GERMINAÇÃO DE PLÂNTULAS - (NÚMERO DE PLÂNTULAS GERMINADAS) (PG), PLÂNTULAS GERMINADAS NA PROPORÇÃO 150 mg (PG150) E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) NAS FAMÍLIAS 6388 E 472B.....	46
TABELA 5	ANÁLISE DE VARIÂNCIA (TESTE F), PARA O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG), E OS PARÂMETROS AVALIADOS 30 DIAS APÓS A SEMEADURA, BEM COMO O TAMANHO TOTAL DE RAÍZES (cm) NA PARCELA (TR), VOLUME TOTAL DE RAÍZES (cm <sup>3</sup> ) NA PARCELA (VR), NÚMERO DE PLÂNTULAS (NP) E TAMANHO DE PLÂNTULAS (TP), DA FAMÍLIA 472B, PARA OS SUBSTRATOS AREIA, VERMICULITA E PLANTMAX®, NOS TRATAMENTOS INOCULADO (MIX EMBRAPA) E NÃO INOCULADO (CONTROLE).....	47
TABELA 6	ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG), DA FAMÍLIA 472B NOS SUBSTRATOS AREIA, VERMICULITA E PLANTMAX®, COM OS TRATAMENTOS INOCULADOS (MIX EMBRAPA) E NÃO INOCULADOS (CONTROLE).....	47
TABELA 7	MÉDIA DO TAMANHO TOTAL DE RAÍZES (cm) E VOLUME TOTAL DE RAÍZES (cm <sup>3</sup> ) NA PARCELA DA FAMÍLIA 472B NOS SUBSTRATOS AREIA, VERMICULITA E PLANTMAX®, COM OS TRATAMENTOS INOCULADOS (MIX EMBRAPA) E NÃO INOCULADOS (CONTROLE).....	49
TABELA 8	MÉDIA DO NÚMERO DE PLÂNTULAS GERMINADAS E MÉDIA DO TAMANHO DE PLÂNTULAS (cm) 30 DIAS APÓS A SEMEADURA, DA FAMÍLIA 472B NOS SUBSTRATOS AREIA, VERMICULITA E PLANTMAX®, COM OS TRATAMENTOS INOCULADOS (MIX EMBRAPA) E NÃO INOCULADOS (CONTROLE).....	50



TABELA 9	ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) E TAMANHO DE PLÂNTULAS (cm) (TP) 30 DIAS APÓS A SEMEADURA, PARA AS FAMÍLIAS 792B E 538A COM OS TRATAMENTOS AUTOCLAVADO E NÃO AUTOCLAVADO PARA O SUBSTRATO COMERCIAL PLANTMAX®.....	51
TABELA 10	ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) E MÉDIA DO TAMANHO DE PLÂNTULAS (cm) 30 DIAS APÓS A SEMEADURA, PARA AS FAMÍLIAS 792B E 538A COM OS TRATAMENTOS AUTOCLAVADO E NÃO AUTOCLAVADO PARA O SUBSTRATO COMERCIAL PLANTMAX®.....	51
TABELA 11	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) NAS FAMÍLIAS 792B E 538A, NOS TRATAMENTOS INOCULADOS NA TURFA E POR IMERSÃO, E O TRATAMENTO SEM INOCULAÇÃO.....	54
TABELA 12	ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) NAS FAMÍLIAS 792B E 538A, QUANTO A INOCULAÇÃO COM O MIX DA EMBRAPA, NOS TRATAMENTOS INOCULADOS NA TURFA E POR IMERSÃO, E O TRATAMENTO SEM INOCULAÇÃO (CONTROLE) .....	55
TABELA 13	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) NAS FAMÍLIAS 479A E 882A, NOS TRATAMENTOS COM INCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS TRIAZO, IC-26 E MIX DA EMBRAPA, E O TRATAMENTO CONTROLE SEM INOCULAÇÃO.....	56
TABELA 14	CRUZAMENTOS (FAMÍLIAS) DE CANA-DE-AÇÚCAR UTILIZADAS NOS DOIS EXPERIMENTOS.....	66
TABELA 15	MIX DA EMBRAPA, COM O NOME CIENTÍFICO E A ESTIRPE CORRESPONDENTE DAS BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS.....	67
TABELA 16	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS FAMÍLIAS 34, 35, 589, 538A E 479A, COM OS TRATAMENTOS MIX EMBRAPA (INOCULAÇÃO COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS) E CONTROLE (SEM INOCULAÇÃO), PARA OS PARÂMETROS AVALIADOS ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG), ESTANDE DE PLÂNTULAS (N15) 15 DIAS APÓS A SEMEADURA (DAS) E 30 DAS (N30), CRESCIMENTO DA POPULAÇÃO (%) DOS 15 DAS AOS 30 DAS (CP) E TAMANHO DE PLÂNTULAS AOS 15 DAS (TP15).....	69

TABELA 17	MÉDIA DO NÚMERO DE PLÂNTULAS (ESTANDE) 15 DIAS APÓS A SEMEADURA (DAS) E 30 DAS, E CRESCIMENTO DA POPULAÇÃO (%) DOS 15 DAS AOS 30 DAS, NAS FAMÍLIAS 34, 35, 589, 538A E 479A, PARA OS TRATAMENTOS COM INOCULAÇÃO (EMBRAPA) E SEM INOCULAÇÃO (CONTROLE).....	69
TABELA 18	ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DAS FAMÍLIAS 34, 35, 589, 538A E 479A, COM OS TRATAMENTOS COM INOCULAÇÃO (EMBRAPA) E SEM INOCULAÇÃO (CONTROLE).....	70
TABELA 19	MÉDIA DO TAMANHO DE PLÂNTULAS (cm) 15 DIAS APÓS A SEMEADURA, DAS FAMÍLIAS 34, 35, 589, 538A E 479A, COM OS TRATAMENTOS INOCULADOS (EMBRAPA) E SEM INOCULAÇÃO (CONTROLE).....	72
TABELA 20	ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS PARÂMETROS TAMANHO DE PLÂNTULAS (cm) (TP) E TAMANHO DE RAÍZES (cm) (TR) 30 DIAS APÓS A SEMEADURA, COM OS TRATAMENTOS INOCULADO (EMBRAPA) E NÃO INOCULADO (CONTROLE), DAS FAMÍLIAS 538A E 479A.....	72
TABELA 21	MÉDIAS DO TAMANHO DE PLÂNTULAS (cm) (TP) E TAMANHO DE RAÍZES (cm) (TR) AOS 30 DIAS APÓS A SEMEADURA, DAS FAMÍLIAS (FAM.) 538A E 479A COM OS TRATAMENTOS (TRAT.) SEM INOCULAÇÃO (CONTROLE) E COM INOCULAÇÃO (EMBRAPA) .....	73

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) E A DOSE UTILIZADA DO INOCULANTE MIX DA EMBRAPA PARA AS FAMÍLIAS 792B E 524.....	52
FIGURA 2	TAMANHO DE PLÂNTULAS (cm) E DOSE UTILIZADA DO INOCULANTE MIX DA EMBRAPA PARA AS FAMÍLIAS 524 E 792B, 30 DIAS APÓS A SEMEADURA.....	53
FIGURA 3	TEOR DE CLOROFILA ( $\text{mg g}^{-1}$ ) NOS TRATAMENTOS NÃO INOCULADO (CONTROLE) E INOCULADOS NO VEÍCULO TURFA (TURFA) E POR IMERSÃO (IMERSO) DO INOCULANTE MIX DA EMBRAPA.....	55
FIGURA 4	ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) NOS TRATAMENTOS SEM INOCULAÇÃO (CONTROLE) E NOS TRATAMENTOS INOCULADOS (EMBRAPA, TRIAZO E IC-26), PARA AS FAMÍLIAS 882A E 479A.....	57
FIGURA 5	COMPARAÇÃO DOS TRATAMENTOS INOCULADO COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS (EMBRAPA) E NÃO INOCULADO (CONTROLE), PARA O PARÂMETRO TAMANHO DE PLÂNTULAS AOS 15 DIAS APÓS A SEMEADURA, DIVIDIDO EM TRÊS ESTRATOS, PORCENTAGEM DO NÚMERO DE PLÂNTULAS MENORES OU IGUAIS A 1 cm ( $\leq 1$ cm), PORCENTAGEM DO NÚMERO DE PLÂNTULAS ENTRE 1 E 2 cm (1-2 cm) E PORCENTAGEM DO NÚMERO DE PLÂNTULAS MAIORES OU IGUAIS A 2 cm ( $\geq 2$ cm) DAS FAMÍLIAS 34, 35, 589, 479A E 538A.....	71

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 A CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR.....</b>	<b>16</b>
2.1.1 A CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	16
2.1.2 A SEMENTE DA CANA-DE-AÇÚCAR E O MELHORAMENTO GENÉTICO.....	17
2.1.3 O MELHORAMENTO DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	17
2.1.4 O NITROGÊNIO NA CANA-DE-AÇÚCAR.....	19
<b>2.2 AS BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS.....</b>	<b>21</b>
2.2.1 UMA ABORDAGEM GERAL SOBRE AS BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS.....	21
2.2.2 CLASSIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS.....	22
2.2.3 AS BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NA CANA-DE-AÇÚCAR.....	23
2.2.4 INOCULANTES DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS.....	24
2.2.4.1 MISTURA DE CINCO ESPÉCIES DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS.....	25
2.2.4.2 INOCULANTES A BASE DE ESTIRPES DE <i>Azospirillum brasilense</i> .....	25
<b>2.3 MELHORAMENTO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA MELHOR ASSOCIAÇÃO COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS.....</b>	<b>26</b>
<b>3 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>29</b>
 <b>CAPÍTULO 1 – PROTOCOLO DE INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL EM SEMENTES DE CANA-DE-AÇÚCAR.....</b>	 <b>37</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>37</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>38</b>
4.1 INTRODUÇÃO.....	39
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.4 CONCLUSÕES.....	58
4.5 REFERÊNCIAS.....	59

<b>CAPÍTULO 2 – INOCULAÇÃO COM MIX DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM ESPIGUETAS DE CINCO FAMÍLIAS DE CANA-DE-AÇÚCAR.....</b>	<b>63</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>63</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>64</b>
5.1 INTRODUÇÃO.....	65
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	66
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
5.4 CONCLUSÕES.....	74
5.5 REFERÊNCIAS.....	75
<b>6 CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>77</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A cana-de-açúcar é uma importante cultura para o Brasil, plantada em aproximadamente 8,4 milhões de hectares, com o Estado do Paraná representando 7,26% desse total (CONAB, 2011). O aumento na importância dessa cultura vem da necessidade por alternativas energéticas mais sustentáveis.

A cana-de-açúcar possui grande importância na produção do açúcar e do álcool (etanol). No caso do etanol, sua destinação é para o abastecimento dos carros *Flex* (bicombustíveis com gasolina e etanol), e também participa com certa porcentagem na mistura da gasolina (MAPA, 2010). Nos últimos anos houve um aumento considerável na frota de carros *Flex* (Alves, 2011), o que acarretou em um aumento no consumo de etanol, e consequente expansão em áreas cultivadas de cana-de-açúcar (CONAB, 2011).

Outra maneira de aumentar a produção, além do aumento de áreas cultivadas, é o desenvolvimento de cultivares adaptadas aos diversos ambientes produtivos, através do melhoramento genético e o manejo mais adequado da cultura, onde a adubação nitrogenada possui grande importância. Temendo a perda por produtividade, muitos produtores podem aplicar superdoses de nitrogênio, acarretando na poluição do ambiente (Carvalho, 2011).

Uma das opções viáveis para diminuir o uso dos adubos nitrogenados e auxiliar nos incrementos de produtividade, seria a aplicação de bactérias diazotróficas. Essas bactérias, possuem a habilidade da fixação biológica do nitrogênio (FBN) (Reis Junior *et al.*, 2000), e também podem produzir reguladores vegetais, como as auxinas (Mirza *et al.*, 2001), giberelinas (Bastián *et al.*, 1998) e citocininas (Tien *et al.*, 1979), e ainda agirem como solubilizadores de fosfato (Song *et al.*, 2008) e auxiliarem na ação contra patógenos (Arencibia *et al.*, 2006).

Portanto, assim como nas leguminosas, onde ocorre a simbiose entre bactérias-planta, como exemplo, o gênero *Bradyrhizobium* e a cultura da soja, nas *Poaceae* como trigo, milho, aveia e a própria cana-de-açúcar a FBN é possível através da associação com as bactérias diazotróficas (Campos *et al.*, 1999; Gomes *et al.*, 2005; Roesch *et al.*, 2005).

Na cana-de-açúcar um exemplo é a interação com a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gillis *et al.*, 1989; Yamada *et al.*, 1998), da qual se tornou uma importante bactéria na explicação de eventos de fixação de nitrogênio em cana-de-açúcar. Essa associação de bactérias com a cana-de-açúcar criou a hipótese para explicar o bom desenvolvimento de cultivares em solos pobres por nutrientes. No entanto, algumas cultivares podem não apresentar uma resposta satisfatória em outros ambientes, levando a crer que pode existir uma especificidade do genótipo a uma espécie, e até estirpes de bactérias, o que foi demonstrado no trabalho de Caballero-Mellado & Muñoz-Rojas (2003).

Atualmente os estudos estão voltados para encontrar em cultivares ou clones respostas à inoculação com bactérias diazotróficas, porém ainda é necessário que sejam realizados testes em fases iniciais do desenvolvimento da cultura, onde há uma maior variabilidade de genótipos e prováveis responsivos.

Portanto, objetivou-se no presente trabalho o desenvolvimento de um protocolo para inoculação de bactérias diazotróficas em sementes de cana-de-açúcar. O trabalho teve como objetivos específicos, avaliar o melhor substrato, formas de aplicação dos inoculantes e verificar a responsividade de famílias à inoculação.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR

#### 2.1.1 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA DA CANA-DE-AÇÚCAR

Segundo a classificação taxonômica de Cronquist em 1981, a cana-de-açúcar passou a ser classificada na família *Poaceae* diferentemente da antiga classificação de Engler em 1887, em que a família era *Gramineae*. Os primeiros cultivos de cana-de-açúcar eram basicamente compostos pela espécie *Saccharum officinarum*, tendo como sua principal característica os altos teores de sacarose. Outras espécies do gênero *Saccharum* são conhecidas, como a *Saccharum spontaneum*, *Saccharum eduli*, *Saccharum barberi*, *Saccharum sinensis* e *Saccharum robustum*. Cada uma delas apresenta uma característica marcante, seja pelo vigor, resistência a estresses e tolerância ou resistência a doenças (Scarpari & Beauclair, 2008).

A cana-de-açúcar é uma planta alógama, ou seja, com alto grau de heterozigose. É uma cultura semi-perene, e apresenta um ciclo de 5 a 10 anos, quando há a renovação do canavial. O seu plantio comercial ocorre pela propagação vegetativa através dos colmos. A propagação sexuada é quase que estritamente destinada ao melhoramento genético, algumas vezes ocorrendo naturalmente em ambientes propícios. A propagação sexuada é inviável para os plantios comerciais e não traz uma homogeneidade, como no plantio por clones. No melhoramento genético a propagação sexual é importante no sentido da formação de novos híbridos, buscando na maioria das vezes, melhoria na produtividade e resistência a doenças nas progênies (Blackburn, 1984; Cesnik & Miocque, 2004; Landell & Bressiani, 2008).



### 2.1.2 A SEMENTE DA CANA-DE-AÇÚCAR E O MELHORAMENTO GENÉTICO

A semente da cana-de-açúcar é originada através dos cruzamentos biparentais, multiparentais, autofecundação e de polinização livre. A inflorescência é do tipo panícula conhecida como flecha, bandeira ou flor, onde se encontram as flores hermafroditas. A inflorescência possui espiguetas, que quando fertilizadas contém as cariopses (sementes) recobertas pelas lemas, páleas e glumas. As espiguetas inférteis não possuem as cariopses (Cabral, 2007). As cariopses apresentam um tamanho de 1,5 mm de comprimento e 0,5 mm de diâmetro transversal, com uma forma elíptica (Bacchi, 1983).

Segundo Breaux & Miller (1987), os maiores problemas para a germinação nos programas de melhoramento de cana-de-açúcar, são atribuídos à perda da viabilidade de cariopses durante a estocagem e a manipulação. Para as plântulas que germinam, esses fatores contribuem também na perda das mudas nos primeiros estádios de crescimento. Outros problemas ligados à má formação das plântulas e inviabilidade de sementes podem ser atribuídos a fungos fitopatogênicos, como os fungos dos gêneros *Curvularia*, *Bipolaris* e *Fusarium* (Martins, 2006; Caieiro, 2008).

Na cana-de-açúcar o florescimento é vital para a manutenção da variabilidade genética da espécie, no entanto, comercialmente ele se torna indesejável, pois em alguns casos a floração acentua perdas de produtividade por processos como a isoporização, do qual transfere açúcares estocados nos colmos para a formação das panículas (Casagrande & Vasconcelos, 2008; Landell & Bressiani, 2008).

### 2.1.3 O MELHORAMENTO DA CANA-DE-AÇÚCAR

O melhoramento de plantas é a base para se obter cultivares superiores e necessário para o estabelecimento de uma cultura nos diferentes ambientes, onde há variações quanto ao regime hídrico, condições de solo e a presença de pragas e doenças. Devido a essas variações e as bruscas mudanças ambientais nos

últimos anos, somados a uma pressão por maiores produtividades, para atender a crescente demanda energética e alimentar, os melhoristas vem concentrando esforços em buscar plantas que tenham características que respeitem essa nova realidade (Cesnik & Miocque, 2004; Tester & Langridge, 2010).

Na cana-de-açúcar o melhoramento teve seu início a partir do momento em que havia uma alta dependência pela espécie *Saccharum officinarum* nos cultivos comerciais, a qual possui excelentes teores de sacarose. Nessa espécie surgiram doenças, e então se iniciou uma busca por cultivares mais resistentes. Melhoristas cruzaram diferentes espécies, se beneficiando das características aceitáveis de cada uma delas, o que deu origem às cultivares modernas, com a terminologia taxonômica de *Saccharum* spp. (Scarpari & Beauclair, 2008)

Atualmente os quatro programas de melhoramento na cana-de-açúcar no Brasil são das instituições: CTC (Centro de Tecnologia Canavieira), IAC (Instituto Agrônomo de Campinas), RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético) e CanaVialis (Monsanto) (Hoffmann, 2008).

Na RIDESA as sementes são originadas nas estações de cruzamento da Serra do Ouro-AL e Devaneio-PE, na primeira fase conhecida como hibridação, geralmente nos períodos entre Março e Junho, e levadas posteriormente para as fases de seleção nos diferentes campos experimentais (RIDESA, 2010).

A próxima fase ou plantio compreende a semeadura das sementes (cariopses) em bandejas nas estufas. As plântulas germinadas são aclimatizadas e posteriormente levadas a campo. As plântulas agora chamadas de *seedlings* são colocadas no campo, para a fase T1 do melhoramento, com a primeira seleção em cana-soca, levando em consideração os atributos visuais, teor de Brix e ausência de doenças. Os genótipos selecionados em T1 irão para a fase T2 (RIDESA, 2011).

Na fase T2, ou primeira propagação vegetativa, há uma pequena quantidade de material vegetal (gemas), por isso o plantio é realizado em Blocos de Federer, e assim como em T1 é realizada análise visual, com avaliação de caracteres agrônômicos. Os melhores genótipos são selecionados e levados a

fase seguinte, fase T3, onde ocorre a avaliação por biometria. A fase de multiplicação dos genótipos (FM), após T3, é realizada com o objetivo de multiplicar os melhores clones selecionados em T3, que serão distribuídos na Fase Experimental (FE), em diversos ambientes para os estudos de adaptabilidade e estabilidade. As outras etapas dizem respeito ao registro, proteção, e a liberação das cultivares (RIDESA, 2011).

#### 2.1.4 O NITROGÊNIO NA CANA-DE-AÇÚCAR

O nitrogênio é o elemento mais abundante na atmosfera na forma do gás  $N_2$ , com aproximadamente 78% do total dos gases. A sua conformação é altamente estável, com uma tripla ligação, exigindo com que haja um alto gasto energético para quebrá-la (Paul & Clark, 1989).

Por ser um macronutriente, é absorvido em grandes quantidades pela cana-de-açúcar. Essa absorção ocorre em 99% dos casos por fluxo de massa e 1% atribuído pela interceptação no sistema radicular (Malavolta *et al.*, 1997), muitas vezes perdendo somente para a absorção de potássio. As plantas absorvem o nitrogênio nas formas dos íons amônio ( $NH_4^+$ ) ou nitrato ( $NO_3^-$ ), o que torna necessário um intermediário para transformar o nitrogênio  $N_2$  indisponível, nas formas disponíveis. Esse intermediário pode ser por vias naturais, pela ação de microorganismos e outras reações do ciclo do nitrogênio, ou ainda sinteticamente, através de processos como o de Haber-Bosch, originando os adubos nitrogenados (Paul & Clark, 1989).

Nas plantas o nitrogênio está presente em muitas reações bioquímicas, sendo muito importante para a fotossíntese, afetando diretamente a atividade da RuBisCo. Portanto, a falta de nitrogênio afeta diretamente a fixação do  $CO_2$ , importante para a manutenção da vida nas plantas, diminuindo o desenvolvimento vegetal e reduzindo o rendimento (Taiz & Zeiger, 2004).

A deficiência de nitrogênio pode ser visível pela clorose em folhas mais velhas e redução das atividades meristemáticas da planta, dando um aspecto de menor “vigor”, devido ao menor perfilhamento, aérea foliar e longevidade das

folhas (Silveira, 1985). A deficiência influencia também a qualidade dos colmos, através do decréscimo no teor de água do colmo, diminuindo a qualidade do caldo, aumentando a concentração de fibras, diminuição na concentração de sacarose no colmo e acúmulo de sacarose nas folhas. Plantas com excesso de nitrogênio podem ter um acúmulo do mesmo no colmo, e consequente redução na qualidade do caldo, atrasando a maturação (Carnaúba, 1990; Silveira & Crocomo, 1990).

Com os dados de Trivelin *et al.* (1995) e Salcedo & Sampaio (1984), tem-se que para uma produtividade de  $100 \text{ t ha}^{-1}$  de colmo, a cana-de-açúcar absorve em torno de 200 a  $300 \text{ kg ha}^{-1}$  de nitrogênio. Ao longo dos anos observou-se que a cultura da cana-de-açúcar absorvia grande parte do nitrogênio oriundo dos estoques naturais do solo, mostrando que o nitrogênio proveniente de outras fontes como a adubação, era pouco significativo. Tratando-se de uma cultura de longo ciclo e com raízes profundas fica mais compreensível tal afirmativa. A baixa eficiência de recuperação e aproveitamento do adubo nitrogenado (residual no solo) na rebrota, faz com que grande parte do nitrogênio seja incorporada na matéria orgânica do solo. Esse nitrogênio incorporado pode chegar a 40% do aplicado inicialmente (Vitti *et al.*, 2008).

No Brasil, as perdas por nitrogênio são pouco significativas quando se trata de lixiviação, grande parte pode ser atribuída à perda de nitrogênio por senescência das plantas, perda pelas raízes no final do ciclo, e também perda de amônia por volatilização através das folhas. Tal fato acontece porque a concentração de amônia na planta é maior que da atmosfera, tendendo a perda por um 'ponto de compensação' da amônia. Outras perdas podem ocorrer, como a desnitrificação, processo em que microrganismos, em meio anaeróbico transformam o nitrogênio 'nitrato', reduzindo a formas gasosas como o  $\text{N}_2$  e o poluente  $\text{N}_2\text{O}$  (Paul & Clark, 1989).

Na agricultura, os adubos nitrogenados sintéticos são um dos principais insumos, aumentando significativamente os custos de produção. Além dos custos elevados, o nitrogênio na forma de adubos é muito dinâmico no solo, o que acarreta em altas perdas quando o manejo da cultura é inadequado,

principalmente as perdas por volatilização e erosão (Paul & Clark, 1989). Na Europa, uma pesquisa realizada pela European Nitrogen Assessment verificou que os ganhos em produtividade pelas altas aplicações de nitrogênio não compensam os custos com os danos ambientais, principalmente na recuperação de áreas poluídas. Como insumo agrícola, os fertilizantes nitrogenados possuem custos muito maiores do que a utilização de alternativas, bem como os microorganismos fixadores de nitrogênio (ENA, 2011).

## **2.2 AS BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS**

### **2.2.1 UMA ABORDAGEM GERAL SOBRE AS BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS**

Conhecidas atualmente pelos seus benefícios às plantas, como a fixação biológica do nitrogênio (FBN), as associações entre bactérias diazotróficas e as plantas, embora não fossem reconhecidas, podiam ser observadas em relatos dos Romanos há mais de 2000 anos, também pelos Chineses em torno de 500 a.C., e na rotação de culturas, da Idade Média até meados do século XIX na Europa (Paul & Clark, 1989).

Uma grande parte do nitrogênio incorporado naturalmente no solo é oriunda da FBN por bactérias conhecidas como diazotrofos. As bactérias diazotróficas podem ser associativas ou simbióticas. O mecanismo consiste no aproveitamento do nitrogênio atmosférico. Comercialmente, em grandes culturas, a FBN é uma ferramenta já utilizada com grande frequência nas leguminosas, principalmente na soja, com ênfase a bactéria do gênero *Bradyrhizobium*. Segundo Moreira (2011) a utilização de inoculantes a base de *Bradyrhizobium* no Brasil, representou uma economia em torno de US\$ 2 bilhões em 2003.

Essas bactérias conhecidas como diazotrofos simbióticos possuem grande habilidade em fornecer nitrogênio para as plantas, através da atividade da nitrogenase das bactérias, que transforma  $N_2$  em  $NH_3$ . A eficiência da nitrogenase é atenuada pela proteção da atividade da mesma através da nodulação de raízes. Na nodulação a bactéria, conhecida como bacterióide, esta dentro do nódulo

formando um “tumor”, onde a simbiose ocorre pelo fornecimento de nutrientes pela planta, enquanto em troca a bactéria fornece o nitrogênio (Marin *et al.*, 1995).

Em *Poaceae* o grande desafio é primeiramente promover a mesma eficiência das bactérias como ocorre nas leguminosas. Os estudos em *Poaceae* avançaram principalmente em trigo e milho, com as bactérias diazotróficas associativas (Hungria, 2011). Além da FBN, o conceito de bactérias promotoras do crescimento vegetal também foi atribuído às bactérias diazotróficas de um modo geral. A maioria delas fornece reguladores vegetais às plantas, como auxinas, giberelinas, citocininas e etileno, estimulando, por exemplo, o desenvolvimento de raízes, acúmulo de massa seca e a germinação de sementes (Hungria, 2011).

Outros trabalhos como o de Cohen *et al.* (2008) e Piccoli *et al.* (2011), verificaram em *Azospirillum brasilense* (Sp245) e em uma provável nova espécie diazotrófica do gênero *Arthrobacter*, a produção de Ácido abscísico (ABA). O ABA atua em diversos mecanismos das plantas, principalmente em mecanismos ligados aos estresses e inibição da germinação de sementes (Taiz & Zeiger, 2004). Piccoli *et al.* (2011) ainda observaram a produção de ácido jasmônico no gênero *Arthrobacter*.

### 2.2.2 CLASSIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

As bactérias fixadoras de nitrogênio podem ser classificadas quanto ao seu modo de interação com a planta. Elas podem formar estruturas (como os nódulos), atuarem dentro da planta (onde há uma menor saturação por O<sub>2</sub>) e próximo ao local que se beneficiará da fixação. Este último é o caso das bactérias livres ou facultativas que atuam na rizosfera. A planta na maioria dos casos serve como fornecedora de nutrientes ao diazotrófico, que em uma via de troca fornece o nitrogênio a planta, na forma de amônia (Paul & Clark, 1989).

Segundo Marin *et al.* (1995), as bactérias diazotróficas podem ser classificadas como:

- Diazotrofos de vida livre: Em sua grande maioria são organismos heterotróficos, necessitando de um sistema que forneça o carbono como

fonte de energia, necessário para a fixação do nitrogênio. Um dos primeiros casos foi o gênero *Beijerinckia* sp., isolada na rizosfera da cana-de-açúcar. As bactérias se encontram no plano próximo as raízes em que exudados são liberados pela planta e servem de fonte energética. Outros gêneros conhecidos são os da família *Azotobacteraceae*, do gênero *Azotobacter*, da qual, segundo Boddey *et al.* (1983), a espécie *Azotobacter paspali* foi a única de vida livre que comprovadamente apresentou uma contribuição de nitrogênio em gramíneas.

- Diazotrofos associativos: Os diazotrofos associativos podem ser endofíticos facultativos ou endofíticos obrigatórios. Os facultativos podem colonizar tanto a rizosfera quanto o interior das plantas e os obrigatórios somente o interior das plantas. Representantes importantes de cada um seriam, o *Azospirillum* sp. como facultativo e o *Herbaspirillum* sp., obrigatório.
- Diazotrofos simbióticos: Os diazotrofos simbióticos são muito conhecidos, em sua maioria podem formar nódulos, onde nessa estrutura os bacterióides farão a troca de nitrogênio com as plantas, absorvendo carbono. São representados principalmente pelos rizóbios.

### 2.2.3 AS BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NA CANA-DE-AÇÚCAR

Na cana-de-açúcar em certos momentos houve questionamentos de como a planta conseguia se desenvolver em diversos ambientes e muitas vezes desfavoráveis, onde era observado que a baixa degradação química (sem sintoma de deficiência de nitrogênio) na cana-de-açúcar poderia ser explicada pela fixação biológica do nitrogênio (FBN) (Döbereiner, 1961).

Um aspecto a ser destacado e observado em outras culturas é a especificidade de certos microorganismos com o genótipo. No trabalho de Salomone & Döbereiner (1996), foi demonstrada a especificidade de determinados genótipos de milho - aumentando sua produtividade - com o gênero *Azospirillum*.

Na cana-de-açúcar, a resposta pela FBN em determinados genótipos foi observado por Urquiaga *et al.* (1992) e Xavier (2006).

Liderados por Döbereiner há aproximadamente 40 anos, pesquisadores investigaram quais estirpes e espécies de bactérias estavam envolvidas no mecanismo da FBN. Foram encontradas inúmeras espécies, com destaque especial para *Acetobacter diazotrophicus*, reclassificada como *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Yamada *et al.*, 1998), uma endofítica obrigatória. Ela foi isolada inicialmente da raiz (Cavalcante & Döbereiner, 1988; Döbereiner, 1988), mas foi observada a sua ocorrência em toda a planta por Reis (1991). A *Gluconacetobacter* é encontrada principalmente nas plantas com alto teor de açúcar como batata-doce e cana-de-açúcar (Baldani & Baldani, 2005).

Reis Junior *et al.* (2000) isolaram as bactérias: *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*, *Herbaspirillum* spp. e *Gluconacetobacter diazotrophicus*, em diferentes partes da planta, em um trabalho com quatro cultivares de cana-de-açúcar. A espécie *Azospirillum amazonense* não foi encontrada nas folhas, somente em colmos e raízes. Perin (2007) isolou o gênero *Burkholderia* em raízes de cana-de-açúcar. Outros dados concernentes às bactérias podem ser encontrados na tabela 1, bem como, outros benefícios na promoção do desenvolvimento vegetal.

#### 2.2.4 INOCULANTES DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

O desenvolvimento de inoculantes com bactérias diazotróficas são ainda pouco explorados nas *Poaceae*. No entanto, com o reconhecimento das bactérias benéficas e o estudo da sua interação, alguns inoculantes vêm surgindo. Para espécies como milho e trigo, já são comercializados inoculantes com bactérias diazotróficas com a espécie *Azospirillum brasilense* (EMBRAPA, 2009). Houve ainda estudos como o mix de bactérias para cana-de-açúcar (Oliveira *et al.* 2002; 2003), no entanto ainda o produto não está sendo comercializado.



#### 2.2.4.1 MISTURA DE CINCO ESPÉCIES DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

Buscando uma maior promoção no crescimento vegetal de plantas de cana-de-açúcar, Oliveira *et al.* (2002; 2003), através de uma mistura de cinco espécies de bactérias diazotróficas, abriram uma nova possibilidade de estudos nesse sentido.

A partir dessa pesquisa realizada na Embrapa Agrobiologia (Seropédica-RJ), foi desenvolvido um 'mix' com cinco bactérias em veículo turfa (Tabela 1). As bactérias diazotróficas da mistura têm como base descobertas anteriores, onde foram isoladas bactérias de tecidos de cultivares comerciais de cana-de-açúcar e outras gramíneas (*Poaceae*).

Com a interação das cinco bactérias, Oliveira *et al.* (2003) observaram uma promoção do crescimento vegetal maior do que se aplicada cada bactéria individualmente, por uma somatória de efeitos benéficos para as plantas. Nesse mesmo trabalho foi observado acréscimo de produtividade para a cultivar SP70-1143.

#### 2.2.4.2 INOCULANTES A BASE DE ESTIRPES DE *Azospirillum brasilense*

Döbereiner *et al.* (1976), isolaram bactérias de raízes de diferentes plantas, coletadas de diferentes regiões ao redor do mundo, e encontraram uma bactéria capaz de fixar nitrogênio, denominada então de *Spirillum lipoferum*. A maior população dessas bactérias foi encontrada (observada) em raízes de *Poaceae*, em especial em países tropicais, com destaque para as raízes coletadas no Brasil.

Estudos posteriores propostos por Tarrand *et al.* (1978), verificaram que das 61 estirpes de *Spirillum lipoferum*, a partir das diferenças de DNA, foi separado em dois grupos distintos, onde no grupo I havia 46 estirpes e no grupo II 15 estirpes. Com esse trabalho ficou definida uma nova classificação, onde surgiu o gênero *Azospirillum*, em que estirpes do grupo II foram nomeadas *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck), e o grupo I nomeado como a espécie *Azospirillum brasilense*. A estirpe Sp 59b foi proposta para *A. lipoferum* e Sp7 para *A.*

*brasiliense*. A *A. brasiliense* pode ser encontrada nas plantas dentro das raízes e na rizosfera das plantas (Schloter & Hartmann, 1997). Segundo Hungria (2011), com a aplicação de *Azospirillum* em trigo e milho, poderia haver uma economia na ordem de 2 bilhões de dólares por ano no Brasil.

Os aumentos de produtividade em decorrência da presença do gênero *Azospirillum* foram identificados por Okon & Labandera-Gonzales (1994) em até 70% dos trabalhos citados. Um dos grandes motivos pelo aumento da biomassa de plantas e incrementos de produtividade é a produção de reguladores vegetais que auxiliam no crescimento de raízes, aumentando a assimilação de água e nutrientes pelas plantas (Bashan & Holguin, 1997; Bastian *et al.*, 1998).

As bactérias do gênero *Azospirillum* são conhecidas por serem microaerófilas, ou seja, desenvolveram um mecanismo para proteger a eficiência da enzima nitrogenase, através da locomoção por flagelos até um ambiente de baixa saturação por oxigênio (Bashan & Holguin, 1997).

Desde então, estudos com *Azospirillum* foram aprofundados e outras espécies foram descobertas como a *Azospirillum amazonense*, *Azospirillum halopraeferans*, *Azospirillum irakense* e *Azospirillum doebereineriae*.

A partir das novas espécies e suas respectivas estirpes, foram observadas as suas interações tanto na planta em que foi isolada quanto em outras plantas da família *Poaceae*. O *Azospirillum brasiliense*, por exemplo, foi isolado primeiramente de raízes de *Digitalia decumbens* (Tarrand *et al.*, 1978) e possui efeito em outras culturas (Hungria, 2011). Das estirpes de *A. brasiliense* mais conhecidas, e que tem apresentado resultados satisfatórios, podem ser citadas as estirpes Ab-v5, Ab-v6 e Ab-v7 (Hungria *et al.*, 2010; Pedrinho *et al.*, 2010).

## **2.3 MELHORAMENTO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA MELHOR ASSOCIAÇÃO COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS**

Os estudos de associação de bactérias diazotróficas são voltados em sua grande maioria para as gramíneas. Os primeiros estudos no Brasil de interação foram desenvolvidos pelas equipes da Embrapa Agrobiologia e da Universidade

Federal Rural do Rio de Janeiro. Döbereiner (1992) demonstrou a interação entre a bactéria *Azotobacter paspali* em associação com *Paspalum notatum*, ocorrendo a fixação biológica e aumentando a biomassa das plantas, e também houve uma melhor associação de bactérias com determinados genótipos. Shrestha & Ladha (1996), observaram em 70 genótipos de arroz uma variação da fixação biológica do nitrogênio na ordem de 1,5% a 21%, demonstrando que há genótipos mais responsivos a determinadas bactérias.

Em cana-de-açúcar a interação entre genótipo e bactérias, foi observada na associação entre a cultivar B-4362 e a bactéria *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, que embora não seja um efeito de fixação biológica do nitrogênio, demonstra que é possível haver interações entre determinados genótipos. O efeito causado por essa associação é a doença da estria mosqueada (Olivares *et al.*, 1997). Em outros trabalhos com outras cultivares a mesma bactéria apresenta resultados com efeitos positivos na promoção do crescimento vegetal (Oliveira *et al.*, 2009).

Estudando efeitos de diferentes estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, Caballero-Mellado & Muñoz-Rojas (2003), demonstraram efeitos positivos na inoculação com cultivares de cana-de-açúcar, no entanto, foi também evidenciado que há uma especificidade entre certos genótipos e estirpes. A melhor associação encontrada foi entre a estirpe Pal5 e a cultivar MEX 57-473.

Xavier (2006) combinou a seleção de genótipos superiores e a introdução de bactérias diazotróficas, com a intenção de estimar a fixação biológica do nitrogênio, apresentando uma nova proposta na redução de adubos nitrogenados. O autor encontrou nas cultivares RB72454, RB825336, RB758540 e RB83509 um alto potencial de fixação biológica do nitrogênio.

TABELA 1. BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS, CLASSIFICAÇÃO, LOCAL DE ISOLAMENTO E OS BENEFÍCIOS ENVOLVIDOS NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL.

BACTÉRIAS (DESCRIPTORIOS)	LOCAL DE ISOLAMENTO	BENEFÍCIOS ÀS PLANTAS	ESTIRPE (Coleção)
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> ** (Gillis <i>et al.</i> , 1989; Yamada <i>et al.</i> , 1998)	<u>Colmo, Folha e Raíz</u> (Gillis <i>et al.</i> , 1989; Yamada <i>et al.</i> , 1998)	<u>Giberelinas e Ácido Indol- Acético</u> (Bastián <i>et al.</i> , 1998)	PAL5 (BR11281)  (Perin <i>et al.</i> , 2004)
<i>Burkholderia tropica</i> ** (Reis <i>et al.</i> , 2004)	<u>Raíz, Colmo(gema)</u> (Oliveira <i>et al.</i> , 2009)	<u>Solubilização de fosfato</u> (Taulé <i>et al.</i> , 2011)	Ppe8 (BR11336)
<i>Azospirillum amazonense</i> * (Magalhaes & Döbereiner, 1984)	<u>Rizosfera e Raíz</u> (Magalhaes & Döbereiner, 1984; Oliveira <i>et al.</i> , 2009)	<u>Ácido Indol-Acético</u> (Reis Junior. <i>et al.</i> , 2004)	CBAmC (BR11145)  (Reis Junior. <i>et al.</i> , 2004)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> ** (Baldani <i>et al.</i> , 1986)	<u>Raíz, Folha e Colmo</u> (Oliveira <i>et al.</i> , 2009; Reis Junior <i>et al.</i> , 2000)	<u>Ácido Indol-Acético</u> (Taulé <i>et al.</i> , 2011)	HRC54 (BR11335)  (Perin <i>et al.</i> , 2004)
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> ** (Baldani <i>et al.</i> , 1996)	<u>Raíz, Colmo e Folha</u> (Oliveira <i>et al.</i> , 2009; Ureta <i>et al.</i> , 1995)	-----	HCc103 (BR11504)

\* Bactéria diazotrófica facultativa

\*\* Bactéria diazotrófica endofítica

### 3 REFERÊNCIAS

- ALVES, P. Vendas de carros flex registram aumento de 8,44% em 2010. **Infomoney**, 2011. Disponível em: <http://www.infomoney.com.br/minhas-financas/carros/noticia/2018868/vendas-carros-flex-registram-aumento-2010>. Acesso em: 11/02/2012.
- ARENCIBIA, A. D.; VINAGRE, F.; ESTEVEZ, Y.; BERNAL, A.; PEREZ, J.; CAVALCANTI, J.; SANTANA, I.; HEMERLY, A. S. *Gluconacetobacter diazotrophicus* Elicits a Sugarcane Defense Response Against a Pathogenic Bacteria *Xanthomonas albilineans*. **Plant Signaling & Behavior**, v.1, n.5, p.265-273, 2006.
- BACCHI, O.O.S. Botânica da cana-de-açúcar. In: ORLANDO FILHO J., **Coord. Nutrição e adubação da cana-de-açúcar no Brasil**. Piracicaba: IAA/PLANALSUCAR, 1983.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a Root Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.36, n.1, p.86-93, 1986.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. History of the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia de Ciências**. Rio de Janeiro, v.77, p.549-579, 2005.
- BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended Description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a Mild Plant Pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and Classification of a Group of Clinical Isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* Species 3. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.46, n.3, p.802-810, 1996.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Azospirillum-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.103-121, 1997.
- BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BOTTINI, R.; BARALDI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A<sub>1</sub> and A<sub>3</sub> by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v.24, n.1, p.7-11, 1998.

BASTOS, I. T.; BARBOSA, M. H. P.; RESENDE, M. D. V.; PETERNELLI, L. A.; SILVEIRA, L. C. I.; DONDA, L. R.; FORTUNATO, A. A., COSTA, P. M. A.; FIGUEIREDO, I. C. R. Avaliação da interação genótipo x ambiente em cana-de-açúcar via modelos mistos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.37, n.4, p.195-203, 2007.

BLACKBURN, F. **Sugar-cane**. 1 ed. New York: Longman, London and New York (Tropical Series), 1984.

BODDEY, R.M.; CHALK, P.M.; VICTORIA, R.L.; MATSUI, E.; DÖBEREINER, J. The use of the <sup>15</sup>N isotope dilution technique to estimate the contribution of associated biological nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of *Paspalum notatum* cv. batatais. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.29, n.8, p.1036-1045, 1983.

BREAUX, R. D.; MILLER, J. D. Seed Handling, germination and seedling propagation. In: HEINZ, J. D. (Ed.). **Sugarcane improvement through breeding**. Elsevier: Amsterdam, 1987. p.p.385-407.

CABALLERO-MELLADO, J.; MUNÓZ-ROJAS, J. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. **Microbial Ecology**, v.46, p.454-464, 2003.

CABRAL, F. F. **Qualidade fisiológica e armazenamento de sementes de cana-de-açúcar provenientes de diferentes cruzamentos**. 62 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2007.

CAIEIRO J. T. **Avaliação da qualidade de sementes (cariopses) de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), como suporte ao melhoramento genético**. 55 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

CAMPOS, B. C.; THEISEN, S.; GNATTA, V. Inoculante “graminante” nas culturas de trigo e aveia. **Ciência Rural**, v.29, n.3, p.401-407, 1999.

CARNAÚBA, B. A. O nitrogênio e a cana-de-açúcar. **STAB – Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.8, n.3-4, p.24-39, 1990.

CARVALHO, P. N. **Valoração das externalidades negativas do ciclo de vida do etanol - o caso da queima da palha da cana-de-açúcar**. 151 f. Dissertação (Mestrado). UFRJ/COPPE/Programa de Planejamento Energético, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER, J. A new Acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, The Hague, v.108, p.23-31, 1988.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J.J.Y. **Melhoramento da cana-de-açúcar**. Brasília: Embrapa, 2004.

COHEN, A. C.; BOTTINI, R.; PICCOLI, P. N. *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. **Plant Growth Regulation**, v. 54, p.97-103, 2008.

CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). **Acompanhamento da Safra Brasileira – Cana-de-açúcar – Safra 2011/12**. 2011. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11\\_08\\_30\\_13\\_41\\_19\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_agosto\\_2011\\_2o\\_lev..pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_08_30_13_41_19_boletim_cana_portugues_-_agosto_2011_2o_lev..pdf). Acesso em: 20/09/2011.

DÖBEREINER, J. Emended Description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a Mild Plant Pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and Classification of a Group of Clinical Isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* Species 3. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.46, n.3, p.802-810, 1996.

DÖBEREINER, J. Isolation and identification of root associated diazotrophs. **Plant and Soil**, v.10, p.207-212, 1988.

DÖBEREINER, J. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugar cane. **Plant and Soil**, v.15, p.211–216, 1961.

DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. In.: CARDOSO, E.J.B.N., TSAI, S.M., NEVES, M.C.P. **Microbiologia do Solo**. Campinas: SBCS, 1992. p.p.173-180.

DÖBEREINER, J.; MARRIEL, I. E.; NERY M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. **Canadian Journal of Microbiology**, v.22, n.10, p.1464-1473, 1976.

EMBRAPA. **Embrapa e UFPR desenvolvem o primeiro inoculante para milho e trigo**. 2009. Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2009/agosto/1a-semana/embrapa-e-ufpr-desenvolvem-primeiro-inoculante-para-milho-e-trigo>. Acesso em: 10/12/2010.

ENA, 2011. **The European Nitrogen Assessment: Sources, Effects and Policy Perspectives**. 1 ed. New York: Cambridge University Press, 2011.

GILLIS, M.; KERSTERS, K.; HOSTE, B.; JANSSENS, D.; KROPPESTEDT, R. M.; STEPHAN, M. P.; TEIXEIRA, K. R. S.; DÖBEREINER, J.; DE LEY, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a Nitrogen-Fixing Acetic Acid Bacterium Associated with Sugarcane. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.39, n.3, p.361-364, 1989.

GOMES, A. A.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R. Relação entre distribuição de nitrogênio e colonização por bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 11, p.1105-1113, 2005.

HOFFMANN H. P. Melhoramento genético e as variedades de cana-de-açúcar. **Opiniões: A biotecnologia aplicada na Cana-de-açúcar**, p.28, Jul-Set, 2008.

HUNGRIA M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil**, v.331, p.413-425, 2010.

HUNGRIA M., 2011. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011.

LANDELL, M. G. A.; BRESSIANI, J. A. Melhoramento genético, caracterização e manejo varietal. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2008. p.p.101-155.

MAGALHAES, F.M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. **Revista de Microbiologia**, v. 15, p.246–252, 1984.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1997.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). **Mistura carburante automotiva (etanol anidro/gasolina)**. 2010. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/arg\\_editor/file/Desenvolvimento\\_Sustentavel/Agroenergia/Orientacoes\\_Tecnicas/01-Mistura%20etanol%20anidro-gasolina-CRONOLOGIA%28Atualiz\\_02\\_09\\_2011%29.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arg_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Agroenergia/Orientacoes_Tecnicas/01-Mistura%20etanol%20anidro-gasolina-CRONOLOGIA%28Atualiz_02_09_2011%29.pdf). Acesso em: 10/02/2012.

MARIN, V. A.; BALDANI V. D.; TEIXEIRA, K. S.; BALDANI, J. **Fixação Biológica de Nitrogênio: Bactérias Fixadoras de Nitrogênio de Importância para a Agricultura Tropical**. Embrapa, 1995. Disponível em: <https://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/doc091.pdf>. Acesso em: 20/09/2010.

MARTINS, T. D. **Fungos associados às sementes de cana-de-açúcar (cariopses) no Brasil: identificação, patogenicidade e controle**. 102 f. Dissertação (Mestrado). Esalq/USP, Piracicaba, 2006.



MIRZA, M. S.; AHMAD, W.; LATIF, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; MALIK, K. A. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. **Plant and Soil**, v. 237, n. 1, p.47-54, 2001.

MOREIRA, F.M.S. **Estirpes de bactérias altamente eficientes que fornecem nitrogênio para a caupi foram selecionadas na UFLA e já são recomendadas para produção de inoculantes comerciais.** 2011. Disponível em: [www.dcs.ufla.br/links/artigocaupi.pdf](http://www.dcs.ufla.br/links/artigocaupi.pdf). Acesso em: 06/12/2011.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALES, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, p.1591–1601, 1994.

OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, v. 135, p.723-737, 1997.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, v.242, p.205-215, 2002.

OLIVEIRA, A.L.M. de; CANUTO, E.D. de; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p.59-61, 2003.

PAUL, E. A.; CLARK, F. E. **Soil Microbiology and Biochemistry**. 1 ed. California: Academic Press, 1989.

PEDRINHO, E. A. N.; GALDIANO JÚNIOR, R. F.; CAMPANHARO, J. C.; ALVES, L. M. C.; LEMOS, E. G. M. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**, v.69, n.4, p.905-911, 2010.

PERIN, L. **Estudo da comunidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em associação com cana-de-açúcar e descrição de *Burkholderia silvatlantica*.** 103 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

PERIN, L.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M. Diversidade de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolada de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.8, p.763-770, 2004.

PICCOLI, P.; TRAVAGLIA, C.; COHEN, A.; SOSA, L.; CORNEJO, P.; MASUELLI, R.; BOTTINI, R. An endophytic bacterium isolated from roots of the halophyte *Prosopis strombulifera* produces ABA, IAA, gibberellins A<sub>1</sub> and A<sub>3</sub> and jasmonic acid in chemically-defined culture medium. **Plant Growth Regulation**, v.64, p.207-210, 2010.

REIS, V. M. **Aspectos ecológicos e fisiológicos da bactéria fixadora de N<sub>2</sub> *Acetobacter diazotrophicus***. Itaguaí: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1991.

REIS, V. M.; DE LOS SANTOS, P. E.; TENARIO-SALGADO, S.; VOGEL, J.; GUYON, S.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.2155-2162, 2004.

REIS JUNIOR, F. B.; SILVA, L. G.; REIS, V. M.; DOBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n. 5, p.985-994, 2000.

REIS JUNIOR, F. B.; SILVA, L. G.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, p.103-113, 2004.

RIDESA. **Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. Catálogo nacional de variedades “RB” de cana-de-açúcar**. 136p. Curitiba, 2010.

RIDESA, 2011. **Melhoramento Genético**. Disponível em: <http://www.ridesa.com.br/?pagina=melhoramento>. Acesso em: 18/12/2011.

ROESCH, L. F. W.; CAMARGO, F. A. O.; SELBACH, P. A.; SA, E. L. S.; PASSAGLIA, L. M. P. Identificação de cultivares de milho eficientes na absorção de nitrogênio e na associação com bactérias diazotróficas. **Ciência Rural**, v.35, n.4, p.924-927, 2005.

SALCEDO, I. H.; SAMPAIO, E. V. S. B.; CARNEIRO, C. J. G. Dinâmica de nutrientes em cana-de-açúcar. I. Eficiência da utilização de uréia-<sup>15</sup>N em aplicação única ou parcelada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.19, n.8, p.943-949, 1984.

SALOMONE, G.; DÖBEREINER, J. Maize genotypes effects on the response to *Azospirillum* inoculation. **Biology Fertilizer Soils**, Oxford, v.21, p.193-196, 1996.

SCARPARI, M. S.; BEAUCLAIR, E. G. F. Anatomia e botânica. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agronômico, 2008. p.p.45-56.

SCHLOTER, M.; HARTAMANN, A. Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studied with strain-specific monoclonal antibodies. **Symbiosis**, v. 25, p.158-179, 1998.

SHRESTHA, R. K.; LADHA J. K. Genotypic variation in promotion of rice dinitrogen fixation as determined by nitrogen-15 dilution. **Soil Science Society of American Journal**, v.60, p.1815–1821, 1996.

SILVEIRA, J. A. G. **Interações entre assimilação de nitrogênio e o crescimento da cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) cultivada em condições de campo**. 152 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1985.

SILVEIRA, J. A. G.; CROCOMO, O. J. Assimilação de nitrogênio em cana-de-açúcar cultivada em presença de elevado nível de N e de vinhaça no solo. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.2, n.2, p.7-15, 1990.

SONG, O.; LEE, S.; LEE, Y.; LEE, S.; KIM, K.; CHOI, Y. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. **Braz. J. Microbiol.**, v.39, n.1, p.151-156, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAULÉ, C.; MAREQUE, C.; BARLOCCO, C.; HACKEMBRUCH, F.; REIS, V. M.; SICARDI, M.; BATTISTONI, F. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant Soil**, 2011. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/143476870v05v304/fulltext.pdf>. Acesso em: 06/12/2011.

TARRAND, J. J.; KRIEG N. R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v.24, n.8, p.967-980, 1978.

TESTER M.; LANGRIDGE P. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. **Science**, v. 327, p.818-822, 2010.

TIEN, T. M.; GASKIN, M. H.; HUBBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 37, p. 1016-1024, 1979.

TRIVELIN, P.C.O.; VICTORIA, R.L.; RODRIGUES, J. C. S. Aproveitamento por soqueira de cana-de-açúcar de final de safra do nitrogênio da aquamônia-<sup>15</sup>N e uréia-<sup>15</sup>N aplicado ao solo em complemento à vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, n.12, p.1375-1385, 1995.

URETA, A.; ALVAREZ, B.; RAMÓN, A.; VERA, M. A.; MARTÍNEZ-DRETS, G. Identification of *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* using biochemical and genetic criteria. **Plant Soil**, v.172, p.271-277, 1995.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugarcane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of América Journal**, v. 56, p.105-114, 1992.

VITTI, A. C.; CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P. C. O.; ROSSETTO, R. Nitrogênio. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. p. p.239-269.

XAVIER, R. P. **Contribuição da fixação biológica de nitrogênio na produção sustentável da cultura de cana-de-açúcar**. 71 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

YAMADA, Y.; HOSHINO, K.; ISHIKAWA, T. Gluconacetobacter nom. corrig. (*Gluconacetobacter* [sic]). In: Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB, List no.64. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.327-328, 1998.

## CAPÍTULO 1

### PROTOCOLO DE INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL EM SEMENTES DE CANA-DE-AÇÚCAR

#### RESUMO

A inoculação de bactérias diazotróficas pode ajudar na redução do uso de adubos nitrogenados, diminuindo custos e melhorando as condições ambientais. Na cana-de-açúcar há uma busca por clones responsivos à inoculação, no entanto a seleção tem sido realizada em fases mais avançadas do melhoramento. Nas fases iniciais há uma alta variabilidade de genótipos e maior probabilidade de encontrar genótipos responsivos. Trabalhos voltados para a inoculação de bactérias diazotróficas em sementes de cana-de-açúcar ainda são pouco explorados. Objetivou-se no presente trabalho desenvolver um protocolo para inoculação em sementes de cana-de-açúcar. Foram realizadas seis etapas distintas e um teste prévio de germinação para testar a viabilidade das famílias no uso do protocolo. Para estabelecer o protocolo foram testadas diferentes densidades de semeadura, substratos, dosagens de inoculantes, modo de aplicação e a interação de três diferentes inoculantes com famílias de cana-de-açúcar, observando-se a reponsividade das mesmas. Dois inoculantes foram formulados com estirpes de *Azospirillum brasilense*, e o outro era uma mistura de bactérias diazotróficas (*Azospirillum amazonense*, *Burkholderia tropica*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Gluconacetobacter diazotrophicus*). Foram realizados os testes em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições e utilizado o teste de Tukey a 0,05 para comparação de médias. O protocolo foi determinado com uma densidade de semeadura de 150 mg, com substrato padrão o Plantmax®, o inoculante mix Embrapa em veículo turfoso e o substrato autoclavado. A utilização do protocolo pode auxiliar em futuros projetos ligados ao melhoramento de plantas em cana-de-açúcar.

**Palavras-chave:** *Saccharum* spp., inoculante, diazotróficos, vigor

## ABSTRACT

### PROTOCOL FOR INOCULATION OF PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIA IN SEEDS OF SUGARCANE

The inoculation of diazotrophic bacteria can help in the reduction of the nitrogen use, reducing costs and improving the environmental conditions. In the sugarcane the selection for responsive clones to the inoculation has been carried out in more advanced phases of breeding. In the initial phases there is high variability of genotypes and greater probability of responsive genotypes. The inoculation of diazotrophic bacteria in sugarcane seeds is still little explored. The aim of this work was to develop a protocol for inoculation in sugarcane seeds. Six distinct stages and a previous test of germination were carried out, to test the viability of the families in the use of the protocol. To establish the protocol different densities of sowing, substrate, dosages of inoculant, way of inoculant application and the interaction of three different inoculants with sugarcane families were tested, observing its response. Two inoculants were based on strains of *Azospirillum brasilense*, the other one was a 'mix' of diazotrophic bacteria (*Azospirillum amazonense*, *Burkholderia tropica*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Gluconacetobacter diazotrophicus*). A completely randomized design was used. The averages were compared by the Tukey test ( $= 0.05$ ). The protocol was determined for density of sowing of 150 mg, the standard substrate was Plantmax®, the peat inoculants Embrapa was chosen and the substrate was autoclaved. The use of the protocol can assist in future on projects to the breeding of plants in sugarcane.

**Key Words:** *Saccharum* spp., inoculant, diazotrophic, vigor

## 4.1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a cana-de-açúcar vem ganhando destaque por ser uma cultura com grande potencial na substituição dos combustíveis não renováveis (Bermann, 2008). Porém, ainda é necessário um maior desenvolvimento tecnológico da cultura visando maiores produtividades.

O melhoramento genético tem sido uma das ferramentas na busca de cultivares mais produtivas. No desenvolvimento das cultivares é importante que haja uma boa diversidade de indivíduos. Essa diversidade é obtida nas sementes oriundas dos cruzamentos com parentais (genótipos) de interesse. Os cruzamentos são basicamente classificados como biparentais (ambos parentais conhecidos) ou policruzamentos (cruzamento dirigido com pólen de diversos parentais masculinos e um parental feminino). As plantas obtidas após o semeio serão selecionadas nas fases do melhoramento, visando o desenvolvimento das cultivares comerciais (Landell & Bressiani, 2008).

Na cana-de-açúcar, as sementes utilizadas são conhecidas como cariopses, bem como na maioria das espécies da família *Poaceae*. As cariopses se encontram dentro das espiguetas que foram fertilizadas. As espiguetas fertilizadas possuem as glumas, páleas e lemas recobrando as cariopses. No caso das espiguetas inférteis, não há a presença da cariopse internamente (Cabral, 2007).

Os fatores que podem influenciar na germinação das cariopses, são o grau de fertilidade, o amadurecimento das sementes, o período de secagem, o armazenamento e a temperatura (Cesnik & Miocque, 2004). Porém para que a germinação ocorra é necessário que haja um balanço no fornecimento de água, oxigênio e temperatura, até o desenvolvimento da plântula, onde a luz passa a ter maior importância (Cabral, 2007).

Após a germinação um dos principais nutrientes no desenvolvimento vegetal é o nitrogênio. Para suprir a necessidade de nitrogênio nas plantas, é muito comum o uso de adubos sintéticos, que podem vir a causar a poluição de águas e ar (Paul & Clark, 1989). Outra forma de se fornecer nitrogênio para as

plantas é através das bactérias diazotróficas, conhecidas pela fixação biológica do nitrogênio (FBN). As bactérias diazotróficas também são consideradas bactérias promotoras do crescimento vegetal de plantas (Plant Growth Promoting Bacteria - PGPB), pois promovem o crescimento de raízes, germinação de sementes e acúmulo de matéria seca, através da produção de reguladores vegetais como, auxinas, giberelinas, citocininas e etileno (Hungria, 2011).

A inoculação de bactérias diazotróficas a nível comercial teve seus primeiros êxitos nas leguminosas, como a conhecida interação entre o gênero *Bradyrhizobium* e a cultura da soja (*Glicine max*) (Brandelero *et al.*, 2009), economizando bilhões de dólares ao ano e menor agressão ao ambiente, quando comparado aos adubos sintéticos. Nas culturas da família *Poaceae*, alguns inoculantes foram desenvolvidos como a mistura (mix) de bactérias para a cana-de-açúcar (Oliveira *et al.*, 2003).

Nas interações de cana-de-açúcar e inoculação de bactérias diazotróficas, a maioria dos genótipos testados são variedades comerciais. Estudos na semeadura onde há uma maior variabilidade de genótipos e prováveis responsivos são pouco explorados. Nas metodologias tradicionais genótipos responsivos poderiam ser eliminados facilmente, visto que muitos são descartados logo após as primeiras fases do melhoramento. Por isso, ainda é necessário o desenvolvimento de metodologias para a inoculação na semeadura.

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver um protocolo de inoculação de bactérias diazotróficas em sementes de cana-de-açúcar.



## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento foi desenvolvido em seis etapas e um teste prévio. O teste e as etapas foram instalados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, a uma temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ , no Laboratório de Micropropagação de Plantas no Setor de Ciências Agrárias (SCA) da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Foram utilizadas bandejas Sanpack® S-94, com a capacidade máxima de 1000 ml ( $\text{cm}^3$ ), com  $650\text{ cm}^3$  de substrato. Foi padronizado que seriam amostradas aleatoriamente as espiguetas – sem separar férteis de inférteis – e essas seriam dispersas homogeneamente em cada bandeja. As espiguetas foram oriundas de cruzamentos (Tabela 2) realizados na Estação de Cruzamento da Serra do Ouro no município de Murici-AL, no período de Março a Junho dos anos de 2009 e 2010.

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa estatístico SISVAR versão 5.3 da Universidade Federal de Lavras (UFLA). O delineamento para todas as etapas foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, excetuando-se duas etapas, onde será indicado o número de repetições. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade, exceto na etapa diferentes concentrações do inoculante “mix de bactérias”, onde as médias foram comparadas com o teste de Scott-Knott a 0,05 de probabilidade.

**TABELA 2 – CRUZAMENTOS (FAMÍLIAS) UTILIZADOS, ANO DO CRUZAMENTO E TIPO DE CRUZAMENTO.**

<b>Famílias</b>	<b>Ano do Cruzamento</b>	<b>Tipo de Cruzamento</b>
6388 (SP80-1520 x ?)	2010	Policruzamento
524 (RB72454 x SP70-1143)	2010	Biparental
472B (RB931003 x RB001913)	2009	Biparental
792B (RB991555 x RB92606)	2009	Biparental
538A (RB865152 x RB92579)	2009	Biparental
479A (RB931611 x RB99386)	2009	Biparental
882A (RB92606 x RB971702)	2009	Biparental

### **Teste Prévio de germinação das famílias de cana-de-açúcar utilizadas**

O teste prévio foi realizado com as famílias (Tabela 2) que seriam utilizadas nas etapas seguintes, com a intenção de eliminar, caso necessário, famílias com

baixa germinação. A metodologia utilizada foi adaptada da proposta no trabalho de Silva *et al.* (2010). Foram utilizadas 500 mg de espiguetas, utilizando o substrato Plantmax®, em quatro repetições, avaliando-se o número de plântulas germinadas aos 15 dias após a semeadura (DAS). A cada três dias as bandejas foram irrigadas com 200 ml de água deionizada.

### **Determinação da densidade de semeadura**

Foram utilizadas duas famílias, a 472B e a 6388 (Tabela 2), com três tratamentos: (1) 150 mg, (2) 300 mg e (3) 450 mg de espiguetas. O substrato utilizado foi o Plantmax®.

Em uma das análises, para que houvesse uma comparação entre as médias dos tratamentos, foi padronizado a proporção de 150 mg para todos os tratamentos. Resultados nas parcelas do tratamento (1) foram divididos pelo denominador 1, nos tratamentos (2) e (3), pelos denominadores 2 e 3 respectivamente.

As avaliações ocorreram diariamente nos primeiros 14 DAS para calcular o Índice de Velocidade de Germinação (IVG) (Maguire, 1962). Foi avaliado também o número de plântulas germinadas aos 15 DAS.

### **Comparação de diferentes substratos e a inoculação de bactérias diazotróficas**

Nessa etapa foi utilizada somente uma família, a 472B (Tabela 2). No tratamento inoculado foi utilizado o inoculante mix da Embrapa em turfa (concentração:  $10^9$  ufc g<sup>-1</sup>) para cana-de-açúcar, com as bactérias diazotróficas: a) *Azospirillum amazonense* (estirpe: CBAmC); b) *Herbaspirillum seropedicae* (estirpe: HRC54); c) *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (estirpe: HCc108); d) *Gluconacetobacter diazotrophicus* (estirpe: PAL5); e e) *Burkholderia tropica* (estirpe: Ppe8).

O delineamento utilizado foi em arranjo fatorial 2 x 3, com um tratamento inoculado (dosagem de 5 g do mix de bactérias na turfa em 650 cm<sup>3</sup> de substrato),

e o outro tratamento sem inoculação, em três diferentes substratos (Areia, Vermiculita e Plantmax®). Padronizou-se para a areia peneira de 710 µm.

As avaliações realizadas foram IVG, e aos 30 DAS foi determinado o tamanho de plântulas (cm) e o número de plântulas por parcela, e ainda as raízes de cada parcela foram lavadas e guardadas separadamente em álcool 50%, conforme a metodologia de Bohm (1979), e então avaliado o tamanho total das raízes (cm) na parcela e volume total de raízes (cm<sup>3</sup>) na parcela, através do programa Win/MacRhizo versão 4.1c, no Laboratório da Fitotecnia no SCA/UFPR.

### **Autoclavagem do substrato**

As famílias utilizadas foram a 792B e a 538A (Tabela 2), com dois tratamentos: (1) substrato Plantmax® autoclavado, em 1 atm 120 °C por 60 minutos; e (2) Plantmax® não autoclavado em arranjo fatorial 2 x 2 (duas famílias x dois tratamentos). Excepcionalmente nessa etapa foram utilizadas oito repetições por tratamento. O parâmetro estimado foi IVG e tamanho de plântulas (cm) aos 30 DAS.

### **Diferentes concentrações do inoculante “mix de bactérias”**

Foram utilizados dois cruzamentos o 792B e o 524 (Tabela 2). Os parentais RB72454 e SP70-1143 da família 524, foram responsivos a bactérias diazotróficas no trabalho de Xavier (2006). Foram utilizados quatro tratamentos, sendo o (1) controle não inoculado, o (2) inoculado com dose padrão 1,6% (50 g de inoculante turfa para 3 kg de Plantmax®), o (3) com dose cinco vezes maior (8%) e (4) com dose cinco vezes menor (0,32%). O substrato Plantmax® foi autoclavado. Foi feita uma análise em arranjo fatorial 2 x 4 (duas famílias x quatro tratamentos). Os parâmetros estimados foram IVG e tamanho de plântula (cm) aos 30 DAS.

### **Forma de aplicação do inoculante “mix de bactérias”**

Foram utilizadas as famílias 792B e 538A (Tabela 2), com três tratamentos. O tratamento controle não foi inoculado. No segundo tratamento, as espiguetas foram imersas em proporção de 125 g do mix para 10 litros de água deionizada

por 30 minutos, o mesmo padrão utilizado para tolete de cana-de-açúcar de 1250 g para 100 litros de água. Para o terceiro tratamento, foi utilizada a dose padrão 1,6%. O substrato utilizado foi o Plantmax® autoclavado. A análise foi realizada em arranjo fatorial 2 x 3 (duas famílias x três tratamentos). Os parâmetros estimados nas avaliações foram IVG, tamanho de plântula (cm) aos 30 DAS e teor de clorofila ( $\text{mg g}^{-1}$ ) segundo a metodologia proposta por Arnon (1949), e Lichtenthaler (1987). Devido a baixa quantidade de material vegetal para avaliar o teor de clorofila ( $\text{mg g}^{-1}$ ), foram realizadas análises compostas com as duas famílias em cada tratamento.

### **Interação família x inoculante**

Foram utilizadas duas famílias, a 479A, aparentemente responsiva ao inoculante da Embrapa em testes preliminares, e a 882A (Tabela 2). Foram utilizados quatro tratamentos: (1) controle (sem inoculação); (2) Inoculado com IC-26; (3) Inoculado com Triazo; e (4) Inoculado com Embrapa turfa conforme dose padrão 1,6%. Os tratamentos (2) e (3) foram diluídos na proporção 1:10 em água deionizada e as espiguetas imersas por 30 minutos antes da semeadura. Os inoculantes utilizados foram cedidos pelo Departamento de Bioquímica da UFPR, e são a base de *Azospirillum brasilense*, das estirpes IC-26 e Triazo (mistura de Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7), ambos na concentração  $10^9$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ . O substrato utilizado foi o Plantmax® autoclavado. Foi realizada uma análise em arranjo fatorial 2x4 (duas famílias x quatro tratamentos). O número de repetições para essa etapa foi três. O parâmetro estimado foi o IVG.

## **4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Teste Prévio de germinação das famílias de cana-de-açúcar utilizadas**

Inicialmente foi realizado um teste prévio para determinar se as famílias de cana-de-açúcar apresentavam uma germinação satisfatória. Por se tratar de cruzamentos com parentais diferentes, houve variações consideráveis entre as famílias (Tabela 3). Cabral (2007), padronizando o peso de espiguetas, observou

uma alta variabilidade de cariopses viáveis comparando cruzamentos biparentais e seus recíprocos (Cesnik & Miocque, 2004), e também os mesmos parentais em policruzamentos.

A alta variabilidade pode ser atribuída à presença de espiguetas férteis e inférteis, originadas a partir do florescimento. A infertilidade das espiguetas pode ser atribuída a diversos fatores, dentre eles umidade e temperatura, criando condições para a presença de fungos fitopatogênicos, como detalhado por Martins (2006) e Caieiro (2008). Outro fator importante pode ser atribuído às características de cada genitor que são passadas para a geração seguinte.

A temperatura na sala de crescimento esteve na média de 25 °C, dentro do espectro de temperatura ideal para germinação em cana-de-açúcar. Segundo Cesnik & Miocque (2004) a temperatura ideal de germinação em cana-de-açúcar esta entre 25 °C e 32 °C, com temperaturas críticas abaixo de 18,5 °C, onde há a inibição da germinação.

**TABELA 3 – MÉDIA GERAL DA GERMINAÇÃO DE PLÂNTULAS EM 500 mg DE ESPIGUETAS NAS DIFERENTES FAMÍLIAS DE CANA-DE-AÇÚCAR AOS 15 DIAS APÓS A SEMEADURA.**

<b>Famílias</b>	<b>Ano do Cruzamento</b>	<b>Média de Plântulas Germinadas em 500 mg</b>
<b>6388 (SP80-1520 x ?)</b>	<b>2010</b>	265
<b>524 (RB72454 x SP70-1143)</b>	<b>2010</b>	39
<b>472B (RB931003 x RB001913)</b>	<b>2009</b>	122
<b>792B (RB991555 x RB92606)</b>	<b>2009</b>	82
<b>538A (RB865152 x RB92579)</b>	<b>2009</b>	61
<b>479A (RB931611 x RB99386)</b>	<b>2009</b>	88
<b>882A (RB92606 x RB971702)</b>	<b>2009</b>	68

### **Determinação da densidade de semeadura**

Em diferentes densidades de semeadura, foi possível visualizar diferenças pronunciadas de germinação entre as famílias, onde a família 6388 teve na média mais que o dobro de germinação da 472B. Comparando as diferentes densidades (150 mg, 300 mg e 450 mg), fica demonstrado que não houve diferença estatística na proporção de 150 mg dentro de cada família, portanto podendo ser utilizada a

menor densidade no protocolo. Avaliando-se o IVG, a família 6388 apresentou um maior vigor de germinação (Tabela 4).

Segundo Silva *et al.* (2010), o parâmetro IVG pode ser utilizado em cana-de-açúcar para se determinar o vigor das plântulas. No mesmo trabalho, assim como no presente estudo foi verificada uma divergência no vigor e germinação entre diferentes famílias.

**TABELA 4 – GERMINAÇÃO DE PLÂNTULAS - (NÚMERO DE PLÂNTULAS GERMINADAS) (PG), PLÂNTULAS GERMINADAS NA PROPORÇÃO 150 mg (PG150) E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) NAS FAMÍLIAS 6388 E 472B.**

Tratamentos	Famílias					
	6388			472B		
	PG	PG150	IVG	PG	PG150	IVG
<b>150 mg</b>	81,5 c	81,5 a	25,0 c	34,2 c	34,2 a	12,9 c
<b>300 mg</b>	177,2 b	88,6 a	51,0 b	68,0 b	34,0 a	25,3 b
<b>450 mg</b>	261,5 a	87,2 a	79,3 a	104,5 a	34,8 a	39,8 a
<b>Coeficiente de Variação (%)</b>	<b>13,68</b>	<b>11,93</b>	<b>24,12</b>	<b>13,68</b>	<b>11,93</b>	<b>24,12</b>

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

### **Comparação de diferentes substratos e a inoculação de bactérias diazotróficas**

Na tabela 5, estão representados os resultados da análise de variância para o parâmetro IVG. Houve interação entre os substratos e os tratamentos, e diferença entre os substratos e entre os tratamentos. O tratamento com o inoculante foi superior nos substratos Areia e Plantmax®, e na Vermiculita não houve diferença entre os tratamentos. Nos diferentes substratos não houve diferença no tratamento controle, e no tratamento com o inoculante o substrato Plantmax® foi superior a todos os outros substratos, sendo a Areia com valores intermediários e a Vermiculita com os menores valores de IVG (Tabela 6).

TABELA 5. ANÁLISE DE VARIÂNCIA (TESTE F), PARA O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG), E OS PARÂMETROS AVALIADOS AOS 30 DIAS APÓS A SEMEADURA, BEM COMO O TAMANHO TOTAL DE RAÍZES (cm) NA PARCELA (TR), VOLUME TOTAL DE RAÍZES (cm<sup>3</sup>) NA PARCELA (VR), NÚMERO DE PLÂNTULAS (NP) E TAMANHO DE PLÂNTULAS (TP), DA FAMÍLIA 472B, PARA OS SUBSTRATOS AREIA, VERMICULITA E PLANTMAX®, NOS TRATAMENTOS INOCULADO (MIX EMBRAPA) E NÃO INOCULADO (CONTROLE).

Fontes de Variação (F.V.)	Graus de Liberdade	Quadrado Médio				
		IVG	TR	VR	NP	TP
<b>Substrato (S)</b>	<b>2</b>	7,20 **	252324,85 **	0,00843 **	107,04 **	37,14 **
<b>Tratamento (T)</b>	<b>1</b>	1,33 *	5988,83 **	0,00002 n.s.	20,17 n.s.	8,42 *
<b>S x T</b>	<b>2</b>	2,78 **	58120,37 **	0,00109 *	13,54 n.s.	0,50 n.s.
<b>Erro experimental</b>	<b>18</b>	0,24	46,25	0,00018	4,77	1,81
<b>Coeficiente de Variação (%)</b>		<b>11,00</b>	<b>2,90</b>	<b>18,05</b>	<b>12,99</b>	<b>16,34</b>

n.s. Não significativo    \*\* Significativo a 1%    \*significativo a 5%

TABELA 6. ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG), DA FAMÍLIA 472B NOS SUBSTRATOS AREIA, VERMICULITA E PLANTMAX®, COM OS TRATAMENTOS INOCULADOS (MIX EMBRAPA) E NÃO INOCULADOS (CONTROLE).

Tratamentos	Substratos		
	Areia	Vermiculita	Plantmax®
<b>Embrapa</b>	5,10 aB	3,16 aC	6,08 aA
<b>Controle</b>	4,36 bA	3,69 aA	4,46 bA

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

Quanto ao desenvolvimento das raízes, houve diferença estatística entre os substratos e interação significativa para os parâmetros tamanho total de raízes e volume total de raízes. Para os tratamentos somente houve diferença estatística entre os tratamentos no parâmetro tamanho total de raízes (Tabela 5).

O substrato areia apresentou um menor desenvolvimento quando comparado aos substratos Vermiculita e Plantmax® (Tabela 7), provavelmente pelo baixo aporte nutritivo da Areia, visto que não houve qualquer complementação de adubação. Houve diferença entre o tamanho das raízes nos tratamentos inoculados, demonstrando maiores respostas para o substrato Plantmax®, onde hipoteticamente houve uma maior persistência do inoculante e interação positiva com o substrato em questão.

O desenvolvimento de raízes do substrato Plantmax® foi superior aos demais em todos os parâmetros. No que tange a interação com o inoculante, a Vermiculita interagiu negativamente, na Areia não houve influência e o Plantmax® respondeu positivamente, se mostrando o melhor substrato (Tabela 7). Há casos em que a Vermiculita pode apresentar resultados superiores, porém o custo do substrato pode não compensar, sendo mais interessante haver a mistura, como no estudo de germinação de cariopses de cana-de-açúcar de Kwon-Ndung & Imolehin (2007).

O maior aporte de nutrientes no Plantmax® e as condições físicas podem ter contribuído para o resultado encontrado. Catunda *et al.* (2008), concluíram que as características físicas do Plantmax®, como maior retenção de água, baixa densidade e maior aeração aumentam as médias de massa seca das raízes. Diniz *et al.* (2006) também verificaram benefícios em tomate, pimentão e mudas de alface.

Na interação positiva as bactérias promotoras do crescimento vegetal de plantas (PGPR), podem produzir reguladores vegetais que auxiliam no desenvolvimento das raízes, bem como as auxinas, produzidas nos ápices radiculares, atuando no crescimento das raízes, expandindo a área de absorção, e aumentando o aporte de nutrientes e água pelas plantas (Taiz & Zeiger, 2004).

Os autores Bashan & Holguin (1997) relataram os efeitos benéficos através da produção de Ácido Indol-acético (AIA) do gênero *Azospirillum* promovendo o crescimento de raízes. Em alface Schlindwein *et al.* (2008) utilizaram a variável IVG, germinação e comprimento de raiz para determinar a resposta de tratamentos inoculados com rizóbios produtores de AIA, e verificaram benefícios da inoculação.



TABELA 7. MÉDIA DO TAMANHO TOTAL DE RAÍZES (cm) E VOLUME TOTAL DE RAÍZES (cm<sup>3</sup>) NA PARCELA DA FAMÍLIA 472B NOS SUBSTRATOS AREIA, VERMICULITA E PLANTMAX®, COM OS TRATAMENTOS INOCULADOS (MIX EMBRAPA) E NÃO INOCULADOS (CONTROLE).

Média do tamanho total de raízes (cm) na parcela			
Tratamentos	Substratos		
	Areia	Vermiculita	Plantmax®
<b>Embrapa</b>	114,08 aB	89,59 bC	546,09 aA
<b>Controle</b>	114,61 aC	210,13 aB	330,25 bA
Média do volume total de raízes (cm <sup>3</sup> ) na parcela			
Tratamentos	Substratos		
	Areia	Vermiculita	Plantmax®
<b>Embrapa</b>	0,09 aB	0,03 bC	0,11 aA
<b>Controle</b>	0,08 aA	0,05 aB	0,09 bA

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

Para tamanho de plântulas, houve diferença significativa entre tratamentos e entre os substratos. Para a interação não houve significância (Tabela 5). Com relação aos tratamentos houve desenvolvimento maior da parte aérea do tratamento inoculado (Tabela 8). O acúmulo da parte aérea pode ter uma relação com o desenvolvimento de raízes, sendo fornecida uma maior quantidade de nutrientes nos tratamentos inoculados.

Quanto a variável tamanho de plântulas nos diferentes substratos, na Areia as plântulas apresentaram um maior desenvolvimento de parte aérea, na Vermiculita os valores foram intermediários e no Plantmax® os menores valores (Tabela 8). Embora no Plantmax® tenha sido observado um menor tamanho médio das plântulas, vale ressaltar que foi o substrato que apresentou o maior número médio de plântulas aos 30 DAS (Tabela 8), o que pôde acarretar em uma maior competição entre as plantas pelo espaço físico das bandejas. Para o substrato Plantmax® no tratamento Embrapa, o número de plântulas germinadas foi maior que no tratamento Controle, porém não houve significância estatística. Na Areia e Vermiculita, houve um menor número de plântulas germinadas quando comparado com o substrato Plantmax® (Tabela 8), e provavelmente as que sobreviveram eram as mais vigorosas, conferindo valores médios maiores no tamanho (Tabela 8).

TABELA 8. MÉDIA DO NÚMERO DE PLÂNTULAS GERMINADAS E MÉDIA DO TAMANHO DE PLÂNTULAS (cm) 30 DIAS APÓS A SEMEADURA, DA FAMÍLIA 472B NOS SUBSTRATOS AREIA, VERMICULITA E PLANTMAX®, COM OS TRATAMENTOS INOCULADOS (MIX EMBRAPA) E NÃO INOCULADOS (CONTROLE).

Média do número de plântulas germinadas			
Tratamentos (T)	Substratos (S)		
	Areia	Vermiculita	Plantmax®
<b>Embrapa</b>	15,75	14,25	23,25
<b>Controle</b>	16,00	13,25	18,50
<b>Média (F.V.) S</b>	15,87 B	13,75 B	20,87 A
Média do tamanho de plântulas (cm)			
Tratamentos (T)	Substratos (S)		
	Areia	Vermiculita	Plantmax®
<b>Embrapa</b>	6,79	8,85	10,85
<b>Controle</b>	5,63	7,15	10,15
<b>Média (F.V.) S</b>	10,50 A	8,00 B	6,21 C

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

### Autoclavagem do substrato

Tentando isolar qualquer efeito que poderia afetar a germinação das sementes o substrato padrão foi autoclavado. Nessa etapa pode ser observado que somente houve diferença significativa entre as famílias para a variável IVG (Tabela 9). Essa diferença é atribuída às características de cada família, que possuem germinação diferente, conforme demonstrado na tabela 3. Para IVG a família 792B foi superior à família 538A (Tabela 10), confirmando os dados apresentados anteriormente (Tabela 3).

Na variável tamanho de plântulas, houve efeito das famílias e tratamentos, e não houve interação (Tabela 9). Assim como citado no parágrafo anterior, com relação às famílias, o maior desenvolvimento da família 792B pode ser atribuído ao maior vigor da mesma. O efeito dos tratamentos demonstra que algum efeito pode ter sido isolado com a autoclavagem do material, permitindo que houvesse um maior desenvolvimento das plântulas em ambas as famílias (Tabela 10).

Portanto, há uma grande importância em autoclavar o material. Ethur *et al.* (2005) e Nogueira *et al.* (2003), demonstraram que a autoclavagem interfere positivamente no desenvolvimento de plantas de diferentes espécies, apresentando os maiores percentuais de germinação e IVG.

TABELA 9. ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) E TAMANHO DE PLÂNTULAS (cm) (TP) 30 DIAS APÓS A SEMEADURA, PARA AS FAMÍLIAS 792B E 538A COM OS TRATAMENTOS AUTOCLAVADO E NÃO AUTOCLAVADO PARA O SUBSTRATO COMERCIAL PLANTMAX®.

Fontes de Variação (F.V.)	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	
		IVG	TP
Família (F)	1	30,713 **	12,992 **
Tratamento (T)	1	0,998 n.s.	9,021 **
F x T	1	1,300 n.s.	0,0536 n.s.
Erro Experimental	28	0,925	0,699
<b>Coeficiente de Variação (%)</b>		<b>15,77</b>	<b>12,63</b>

n.s. Não significativo    \*\* Significativo a 1%    \*significativo a 5%

TABELA 10. ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) E MÉDIA DO TAMANHO DE PLÂNTULAS (cm) 30 DIAS APÓS A SEMEADURA, PARA AS FAMÍLIAS 792B E 538A COM OS TRATAMENTOS AUTOCLAVADO E NÃO AUTOCLAVADO PARA O SUBSTRATO COMERCIAL PLANTMAX®.

IVG			
Tratamentos	Famílias		
	538A	792B	
Autoclavado	4,74	7,10	
Não Autoclavado	5,49	7,05	
<b>Média (F.V.) F</b>	<b>5,12 B</b>	<b>7,07 A</b>	
Média do tamanho de plântulas (cm) aos 30 DAS			
Tratamentos	Famílias		Média (F.V.) T
	538A	792B	
Autoclavado	6,48	7,83	7,15 a
Não Autoclavado	5,50	6,69	6,09 b
<b>Média (F.V.) F</b>	<b>5,99 B</b>	<b>7,26 A</b>	

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

### Diferentes concentrações do inoculante “mix de bactérias”

Na Figura 1 o cruzamento 792B, no que condiz ao vigor das plântulas, demonstra que provavelmente a família não é responsiva a inoculação com bactérias diazotróficas por não apresentar diferenças entre os tratamentos sem inoculação (0%) e as doses 1,6% e 8%. Há casos na literatura que clones não apresentaram resposta à inoculação. Urquiaga *et al.* (2011) apontaram a cultivar Chunnee (*Saccharum barberi*) como não responsiva às bactérias diazotróficas, considerando esse genótipo como um padrão de pouca responsividade.

Xavier (2006) observou que alguns fatores influenciam na contribuição pela FBN, dentre eles o tipo de solo e o ciclo da cultura, levando a crer que cada solo pode ter uma fauna e flora distintas, mudando a resposta das bactérias para cada região.

Está demonstrado na Figura 1 que há um certo padrão de resposta das famílias para as doses utilizadas, exceto na dose de 1,6% da família 524, da qual a resposta foi superior as outras doses. Onde não houve inoculação, ou seja, dose 0%, houve diferença para os tratamentos 1,6% e 8% na família 524, sendo os dois últimos superiores. Na dose 0,32% ocorreu um dado interessante, onde houve um menor vigor das plântulas, com as linhas das duas famílias seguindo a mesma tendência. A família 792B se mostrou mais vigorosa onde não houve inoculação e para as doses de 1,6% e 8%.

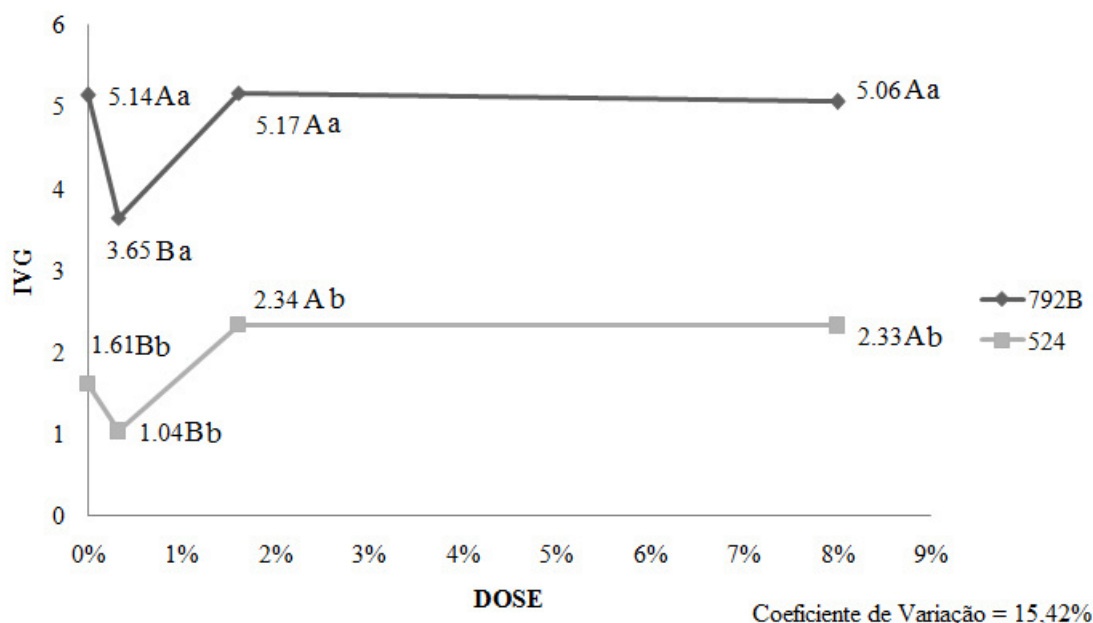


FIGURA 1. ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) E A DOSE UTILIZADA DO INOCULANTE MIX DA EMBRAPA PARA AS FAMÍLIAS 792B E 524.

Médias seguidas de mesma letra minúscula são parâmetro de comparação entre as famílias, e médias seguidas de mesma letra maiúscula são parâmetro de comparação dentro das famílias, pelo teste de Scott-Knott a 0,05 de probabilidade.

A família 524, cruzamento das cultivares responsivas RB72454 como mãe e a SP70-1143 como pai, não apresentou diferença estatística entre os tratamentos,

e portanto estatisticamente não foi responsiva para as doses estudadas para tamanho de plântula (Figura 2). Em valores absolutos a dose 1,6% foi superior. Na família 792B, confirmando os dados de IVG, ficou demonstrado que a família não é responsiva para o parâmetro estimado, apresentando nos tratamentos inoculados valores inferiores ao tratamento sem inoculação. Dentro das doses estudadas houve uma tendência em reduzir a média do tamanho das plântulas, excetuando-se a dose 1,6% para a família 524. A dose 1,6% foi a única que se apresentou estatisticamente igual nas duas famílias, demonstrando uma interação inoculante x família. Boddey *et al.* (2001), verificaram a resposta positiva da RB72454 para FBN em solos pobres, contrário ao substrato Plantmax®, que apresentava condições ideais de germinação. Silva *et al.* (2009), observaram aumento de produtividade nos tratamentos inoculados da RB72454.

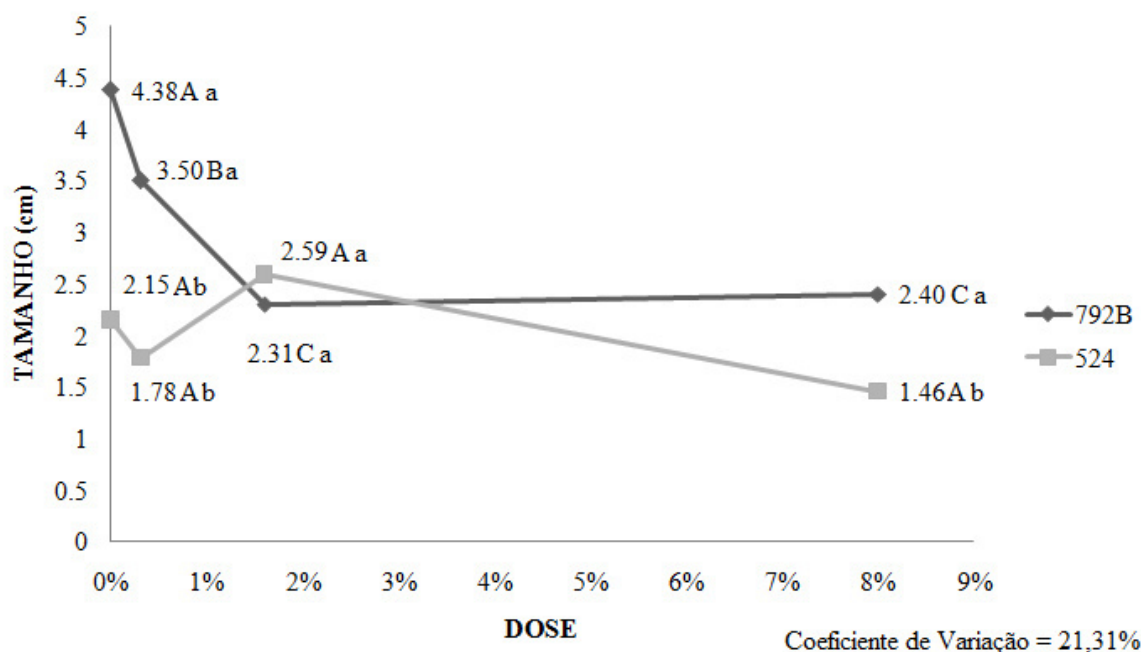


FIGURA 2. TAMANHO DE PLÂNTULAS (cm) E DOSE UTILIZADA DO INOCULANTE MIX DA EMBRAPA PARA AS FAMÍLIAS 524 E 792B, 30 DIAS APÓS A SEMEADURA.

Médias seguidas de mesma letra minúscula são parâmetro de comparação entre as famílias, e médias seguidas de mesma letra maiúscula são parâmetro de comparação dentro das famílias, pelo teste de Scott-Knott a 0,05 de probabilidade.

### Forma de aplicação do inoculante “mix de bactérias”

Quanto a forma de aplicação do inoculante, foi analisado através de duas famílias distintas a responsividade a bactérias diazotróficas. Houve diferença significativa entre as famílias, tratamentos e a interação para IVG (Tabela 11). Como apresentado anteriormente, nas figuras 1 e 2, era esperado que a família 792B não respondesse ao inoculante. Porém quando a aplicação do inoculante foi pela imersão, os valores de IVG foram menores que na turfa, a qual não apresentou diferença estatística para o tratamento sem inoculação.

Comercialmente há uma recomendação de imersão dos toletes (rebolos) com o inoculante da Embrapa, porém pelos resultados apresentados, não fica recomendado fazer a inoculação por imersão em espiguetas. Nas famílias 538A e 792B o tratamento utilizando somente a turfa foi superior em relação ao tratamento por imersão, principalmente na família 538A, onde o tratamento com a turfa foi superior a todos os outros tratamentos (Tabela 12).

Ainda não há trabalhos conclusivos de uma melhor forma de aplicação desse inoculante, principalmente porque o presente trabalho é um dos primeiros que associa esse mix a espiguetas de cana-de-açúcar. Silva *et al.* (2009), utilizaram veículos inoculantes diferentes do turfoso, com o mesmo mix de bactérias e verificaram incrementos na produtividade de colmos e de massa seca. Segundo os autores Silva & Reis (2009), de todos os inoculantes aplicados no Brasil nas diversas culturas, incluindo as leguminosas, o inoculante no veículo líquido é o mais utilizado no mercado brasileiro, provavelmente pela facilidade da sua aplicação a campo com pulverizadores, evitando riscos de entupimento de bicos.

TABELA 11. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) NAS FAMÍLIAS 792B E 538A, NOS TRATAMENTOS INOCULADOS NA TURFA E POR IMERSÃO, E O TRATAMENTO SEM INOCULAÇÃO.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio
Família (F)	1	18,780 **
Tratamento (T)	2	48,991 **
F x T	2	13,376 **
Erro Experimental	18	0,696
<b>Coeficiente de Variação (%)</b>	<b>12,14</b>	

\*\*significativo a 1%

TABELA 12. ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) NAS FAMÍLIAS 792B E 538A, QUANTO A INOCULAÇÃO COM O MIX DA EMBRAPA, NOS TRATAMENTOS INOCULADOS NA TURFA E POR IMERSÃO (IMERSO), E O TRATAMENTO SEM INOCULAÇÃO (CONTROLE).

Famílias	Tratamentos		
	Controle	Imerso	Turfa
792B	8,70 aAB	5,51 aB	9,06 aA
538A	4,39 bB	3,65 aB	9,92 aA

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

Quanto ao teor de clorofila, foram encontrados valores superiores nos tratamentos inoculados (Figura 3), o que pode ser atribuído indiretamente pelo acúmulo de nitrogênio pela fixação biológica. O inoculante na turfa foi superior aos outros tratamentos. Na determinação do teor de clorofila alguns trabalhos verificaram uma correlação positiva entre o nitrogênio e clorofila. Fitzgerald *et al.* (2010), encontraram resposta com metodologia de determinação de nitrogênio via indireta. Na literatura também encontram-se trabalhos onde foi relatado incrementos em vários pigmentos fotossintéticos como a clorofila através da inoculação (Bashan *et al.*, 2006; Barassi *et al.*, 2008).

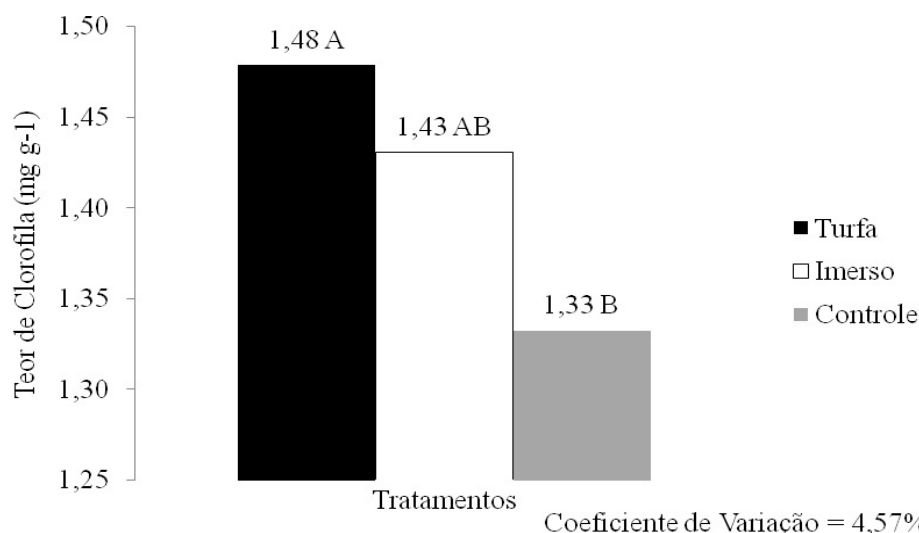


FIGURA 3. TEOR DE CLOROFILA (mg g<sup>-1</sup>) NOS TRATAMENTOS NÃO INOCULADO (CONTROLE) E INOCULADOS NO VEÍCULO TURFA (TURFA) E POR IMERSÃO (IMERSO) DO INOCULANTE MIX DA EMBRAPA.

Médias seguidas de mesma letra maiúscula, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

### Interação família x inoculante

Houve significância para todos os fatores estudados nessa etapa (Tabela 13). Conforme a figura 4, para a família 882A, os tratamentos controle e IC-26 foram superiores, e o tratamento com o mix da Embrapa inferior a todos, demonstrando que pode haver uma especificidade da família quando se utiliza estirpes diferentes de *Azospirillum brasilense*. No trabalho de Caballero-Mellado & Muñoz-Rojas (2003), houve uma melhor associação entre a estirpe Pal5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* e o genótipo MEX 57-473.

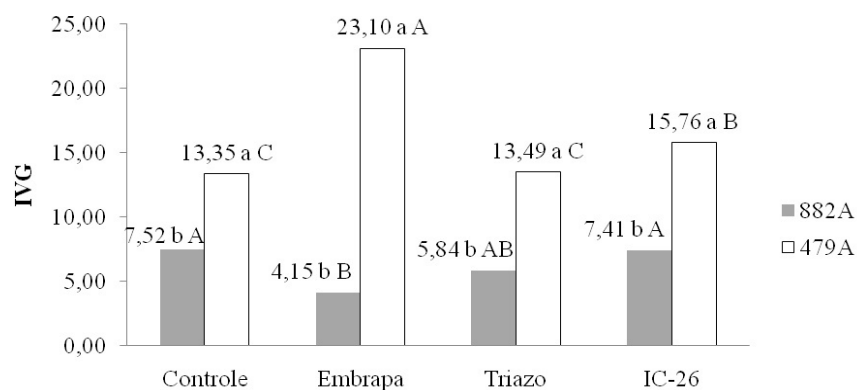
A família 479A apresentou resultados superiores no inoculante Embrapa, e não apresentou diferença significativa entre controle e Triazo. Houve uma leve superioridade no tratamento IC-26 em comparação com controle e Triazo. O maior vigor de plântulas no tratamento com o mix da Embrapa pode ser explicado pela produção de reguladores vegetais pelas bactérias. A resposta positiva de germinação pode estar aliada a produção de ácido giberélico (Piccoli *et al.*, 2010), que atua na síntese da  $\alpha$ -amilase na camada de aleurona, estimulando a germinação. Ainda, associadas as auxinas, as giberelinas regulam eventos que levam à replicação do DNA (Taiz & Zeiger, 2004).

TABELA 13. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) NAS FAMÍLIAS 479A E 882A, NOS TRATAMENTOS COM INCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS TRIAZO, IC-26 E MIX DA EMBRAPA, E O TRATAMENTO CONTROLE SEM INOCULAÇÃO.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio
Família (F)	1	623,832 **
Tratamento (T)	3	17,776 **
F x T	3	52,821 **
Erro Experimental	16	0,645
Total corrigido	23	
Coeficiente de Variação (%)	7,09	

\*\*significativo a 1%





Coeficiente de Variação = 7,09%

**FIGURA 4. INDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) NOS TRATAMENTOS SEM INOCULAÇÃO (CONTROLE) E NOS TRATAMENTOS INOCULADOS (EMBRAPA, TRIAZO E IC-26), PARA AS FAMÍLIAS 882A E 479A.**

Médias seguidas de mesma letra minúscula são parâmetro de comparação entre as famílias no mesmo tratamento e maiúscula comparando diferentes tratamentos na mesma família, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

#### 4.4 CONCLUSÕES

O protocolo ficou definido por:

1. 150 mg de espiguetas, por ser uma baixa densidade evitando perdas do lote nos testes.
2. O substrato padrão é o Plantmax®, pois apresentou maior eficiência em demonstrar a interação entre famílias e bactérias diazotróficas.
3. Quando o substrato foi autoclavado houve maior desenvolvimento de plântulas no material autoclavado, por isso fica recomendado autoclavar o substrato.
4. O veículo turfoso do mix Embrapa mostrou os melhores resultados.
5. Fica recomendada a dose de 1,6% do mix Embrapa. Recomendam-se ainda outros estudos verificando as doses mais baixas e a interação negativa das famílias, como ocorrido na dose 0,32%, para o parâmetro IVG.

#### 4.5 REFERÊNCIAS

ARNON, D.J. Copper enzymes in isolated chloroplast polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v.24, p.1-15, 1949

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.103-121, 1997.

BASHAN, Y.; BUSTILLOS, J.J.; LEYVA, L.A.; HERNANDEZ, J.-P.; BACILIO, M. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. **Biology and Fertility of Soils**, v.42, p.279-285, 2006.

BARASSI, C.A.; SUELDO, R.J.; CREUS, C.M.; CARROZZI, L.E.; CASANOVAS, W.M.; PEREYRA, M.A. Potencialidad de *Azospirillum* en optimizar el crecimiento vegetal bajo condiciones adversas. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008, p. p.49-59.

BERMAN, C. Crise ambiental e as energias renováveis. **Ciência e Cultura (Online)**, v.60, n.3, p.20-29, 2008.

BODDEY, R. M.; POLIDORO, J. C.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Use of the  $^{15}\text{N}$  natural abundance technique for the quantification of the contribution of  $\text{N}_2$  fixation to sugar cane and other grasses. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, n.9, p.889–895, 2001.

BOHM, W. **Methods of studying root systems**. New York: Springer-Verlag, 1979.

BRANDELERO, E. M.; PEIXOTO, C. P.; RALISCH R. Nodulação de cultivares de soja e seus efeitos no rendimento de grãos. **Semina: Ciências Agrárias**, v.30, n.3, p.581-588, 2009.

CABALLERO-MELLADO, J.; MUNÓZ-ROJAS, J. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. **Microbial Ecology**, v.46, p.454-464, 2003.

CABRAL, F. F. **Qualidade fisiológica e armazenamento de sementes de cana-de-açúcar provenientes de diferentes cruzamentos**. 62 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2007.

CAIEIRO J. T. **Avaliação da qualidade de sementes (cariopses) de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), como suporte ao melhoramento genético**. 55 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

CATUNDA, P. H. A.; MARINHO, C. S.; GOMES, M. M. A.; CARVALHO, A. J. C. Brassinoesteróides e substratos na aclimatização do abacaxizeiro 'imperial'. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.40, n.3, p.345-352, 2008.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J.J.Y. **Melhoramento da cana-de-açúcar**. Brasília: Embrapa, 2004.

DINIZ K. A.; GUIMARAES, S. T. M. R.; LUZ, J. M. Q. Húmus como substrato para a produção de mudas de tomate, pimentão e alface. **Bioscience Journal**, v.22, n.3, p.63-70, 2006.

ETHUR, L. Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.; SILVA, A. C. F.; STEFANELLO, D. R.; ROCHA, E. K. Fungos Antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em Pepineiro Cultivado em Estufa. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.127-133, 2005.

FITZGERALD, G.; RODRIGUEZ, D.; O'LEARY, G. Measuring and predicting canopy nitrogen nutrition in wheat using a spectral index—The canopy chlorophyll content index (CCCI). **Field Crops Research**, v.116, n.3, p.318-324, 2010.

HUNGRIA M., 2011. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011.

KWON-NDUNG, E. H. & IMOLEHIN, E. D. Evaluation of sugarcane seedlings from biparental crosses using different growth substrates. **African Crop Science Conference Proceedings**, v.8, p.139-142, 2007.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. In: COLOWICK, S. P., KAPLAN, N.O. (Ed.): **Methods in Enzymology**, v.148, Academic Press, p.350-382, 1987.

LANDELL, M. G. A.; BRESSIANI, J. A. Melhoramento genético, caracterização e manejo varietal. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2008. p. p.101-155.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.1, p.176-177, 1962.

MARTINS, T. D. **Fungos associados às sementes de cana-de-açúcar (cariopses) no Brasil: identificação, patogenicidade e controle**. 102 f. Dissertação (Mestrado). Esalq/USP, Piracicaba, 2006.

NOGUEIRA, R. J. M. C.; ALBUQUERQUE, M. B.; SILVA JUNIOR, J. F. Efeito do substrato na emergência, crescimento e comportamento estomático em plântulas de mangabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, n.1, p.15-18, 2003.

OLIVEIRA, A.L.M. de; CANUTO, E.D. de; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p.59-61, 2003.

PAUL, E. A.; CLARK, F. E. **Soil Microbiology and Biochemistry**. 1 ed. California: Academic Press, 1989.

PICCOLI, P.; TRAVAGLIA, C.; COHEN, A.; SOSA, L.; CORNEJO, P.; MASUELLI, R.; BOTTINI, R. An endophytic bacterium isolated from roots of the halophyte *Prosopis strombulifera* produces ABA, IAA, gibberellins A<sub>1</sub> and A<sub>3</sub> and jasmonic acid in chemically-defined culture medium. **Plant Growth Regulation**, v.64, p.207-210, 2010.

RIDESA. **Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. Catálogo nacional de variedades “RB” de cana-de-açúcar**. Curitiba, 2010.

RIDESA, 2011. **Melhoramento Genético**. Disponível em: <http://www.ridesa.com.br/?pagina=melhoramento>. Acesso em: 18/12/2011.

SCHLINDWEIN, G.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; AZAMBUJA, A. C.; GRANADA, C. E.; GABIATTI, N. C.; PRATES, F.; STUMPF, R. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface. **Ciência Rural**, v.38, n.3, p.658-664, 2008.

SILVA, M. A.; MARINA, M. C.; PERECIN, D.; BRESSIANI, J. A. Comparação de ambientes na germinação de cariopses de cana-de-açúcar. **Ciência e Agrotecnologia**, v.34, Edição Especial, p.1604-1609, 2010.

SILVA, M. F.; OLIVEIRA, P. J.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; REIS, V. M. Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura da cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.11, p.1437-1443, 2009.

SILVA, M.; REIS, V. M. Produção, caracterização e aplicação de anticorpo policlonal contra *Azospirillum amazonense* estirpe AM15. **Bragantia**, v.68, n.1, p.1-11, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugarcane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of América Journal**, v.56, p.105-114, 1992.

URQUIAGA, S.; XAVIER, R. P.; MORAIS, R. F.; BATISTA, R. B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J. M.; MAIA E SÁ, J.; BARBOSA, K. P.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; *et al.* Evidence from field nitrogen balance and  $^{15}\text{N}$  natural abundance data for the contribution of biological  $\text{N}_2$  fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant Soil**, 2011. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/a787uj70556w5012/fulltext.pdf>. Acesso em: 06/12/2011.

XAVIER, R. P. **Contribuição da fixação biológica de nitrogênio na produção sustentável da cultura de cana-de-açúcar**. 71 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

## CAPÍTULO 2

### INOCULAÇÃO COM MIX DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM ESPIQUETAS DE CINCO FAMÍLIAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

#### RESUMO

O uso de adubos nitrogenados é muito importante para o desenvolvimento da cana-de-açúcar, porém o manejo incorreto pode gerar danos ao meio ambiente. Uma das alternativas para substituir total ou parcialmente esses adubos são as bactérias diazotróficas. Seus benefícios são a fixação biológica do nitrogênio e a promoção do crescimento através da produção de reguladores vegetais. Entretanto, o efeito das bactérias depende do genótipo vegetal, ou seja, há uma interação genótipo-bactéria. Nesse sentido a avaliação de famílias nas primeiras fases de seleção pode identificar responsivos às bactérias diazotróficas. Dessa forma, objetivou-se avaliar cinco famílias de cana-de-açúcar e sua resposta a inoculação com bactérias diazotróficas na semeadura. O trabalho foi dividido em dois experimentos, ambos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições e com dois tratamentos (inoculado com bactérias diazotróficas e não inoculado), e o teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparação de médias. No primeiro experimento (E1) em fatorial 2 x 5 cinco famílias de cana-de-açúcar foram avaliadas quanto ao Índice de velocidade de germinação (IVG), estande de plântulas aos 15 e 30 dias após a semeadura (DAS) e tamanho de plântulas aos 15 DAS. No segundo experimento (E2) em fatorial 2 x 2, as famílias 479A e 538A do E1 foram utilizadas para verificar os efeitos da inoculação no desenvolvimento de raízes e parte aérea aos 30 DAS. Houve responsividade ao inoculante em quatro famílias, havendo maior vigor, tamanho de plântulas e raízes. O uso dos inoculantes em fases iniciais do melhoramento pode auxiliar na seleção de famílias responsivas.

**Palavras-chave:** *Saccharum* spp., inoculante, bactérias promotoras do crescimento vegetal, IVG.

## ABSTRACT

### INOCULATION WITH MIX OF DIAZOTROPHIC BACTERIA IN SEEDS OF FIVE FAMILIES OF SUGARCANE

The nitrogen fertilization is very important for the development of the sugarcane, but the incorrect use can generate damages to the environment. One of the alternatives to substitute totally or partially the fertilizer is the diazotrophic bacteria. Its benefits are the biological nitrogen fixation and the promotion of the growth through production of plant regulators. However, the effect of bacteria depends on the plant genotype, in other words there is a bacteria-genotype interaction. In this way, the evaluation on early stages of breeding may identify responsive genotypes to diazotrophic bacteria. Thus, the objective of this study was to evaluate five families of sugarcane and its response to the inoculation with diazotrophic bacteria in the sowing. The work was divided in two experiments, both in completely randomized design and four repetitions, with two treatments (inoculated with diazotrophic bacteria and not inoculated), and the averages were compared by the Tukey test ( $\alpha=0.05$ ). The first experiment (E1) was in a  $2 \times 5$  factorial scheme. Five families of sugarcane have been evaluated to the speed of germination index (SIG), size of population at 15 and 30 days after sowing (DAS) and size of seedlings at 15 DAS. The second experiment (E2) was in a  $2 \times 2$  factorial scheme, where the families 479A and 538A have been used to verify the effect of the inoculation in the development of roots and aerial part at 30 (DAS). There were effect of inoculants in four families, with growth promotion in vigor, size of seedlings and roots. The use of the inoculants in initial phases of the breeding programs may help in the selection of responsive families.

**Key-words:** *Saccharum* spp., inoculant, PGPB, SGI.



## 5.1 INTRODUÇÃO

Com o aumento da área plantada da cana-de-açúcar no Brasil e um apelo pela menor utilização de produtos químicos (adubos sintéticos ou pesticidas) nas principais culturas, trabalhos voltados para uma agricultura mais sustentável vem ganhando maior importância. A adubação nitrogenada pode causar a poluição de águas e ar, dependendo do manejo aplicado (IFA, 2000). O uso racional de fertilizantes concomitantemente com outras técnicas pode ter resultados surpreendentes na minimização do impacto ambiental de uma cultura.

Trabalhos com bactérias diazotróficas demonstraram economia na aplicação de adubos nitrogenados (Hungria, 2011), trazendo uma nova alternativa de manejo cultural. As bactérias diazotróficas possuem a habilidade da fixação biológica do nitrogênio (FBN) atmosférico, fornecendo às plantas uma boa parte de suas necessidades nutricionais, ou produzindo reguladores vegetais que aumentam a área de absorção das raízes, consequentemente maior sequestro de nutrientes do solo (Esquivel-Cote *et al.*, 2010; Hungria, 2011). Dos reguladores vegetais mais conhecidos e produzidos pelas bactérias diazotróficas tem-se as giberelinas (Kang *et al.*, 2010), citocininas, auxinas (Gray & Simith, 2005) e o etileno (Hungria, 2011).

Na cana-de-açúcar alguns trabalhos foram desenvolvidos visando buscar cultivares responsivas às bactérias diazotróficas (Schultz *et al.*, 2012). Entretanto, os genótipos avaliados para associação com bactérias diazotróficas são cultivares comerciais do setor sucroenergético, como no trabalho de Xavier (2006). Esses genótipos passaram por avaliações nas fases iniciais dos programas de melhoramento (Landell & Bressiani, 2008), sem avaliar o potencial quanto a inoculação, descartando a possibilidade de um estudo com bactérias diazotróficas em fases com uma maior variabilidade de indivíduos (alta variabilidade genética), como na semeadura.

Os cruzamentos na cana-de-açúcar são realizados em estações de cruzamento de cada programa de melhoramento, utilizando parentais com interesses agrônômicos, visando progênies superiores. As progênies de cada

cruzamento são genótipos próximos geneticamente e conhecidas como famílias. Dessas progênes serão selecionados os clones para se tornarem cultivares comerciais (Barbosa e Silveira, 2010).

A inflorescência da cana-de-açúcar é uma panícula que contém as espiguetas, sendo as espiguetas férteis as que apresentam glumas, páleas e lemas recobrando as cariopses. As inférteis são as que foram abortadas e não apresentam as cariopses internamente (Cabral, 2007).

Objetivou-se avaliar cinco famílias de cana-de-açúcar e sua resposta a inoculação com bactérias diazotróficas na semeadura.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micropropagação de Plantas no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, e dividido em experimento 1 (E1) e experimento 2 (E2). Na Tabela 14 têm-se a relação das famílias utilizadas nos experimentos. As sementes foram fornecidas pela Universidade Federal de Alagoas, oriundas de cruzamentos biparentais da Estação de Cruzamento da Serra do Ouro, que se encontra no município de Murici, AL.

TABELA 14. CRUZAMENTOS (FAMÍLIAS) DE CANA-DE-AÇÚCAR UTILIZADAS NOS DOIS EXPERIMENTOS.

Experimentos	Cruzamento (ano)	Genitores	
		Feminino	Masculino
<b>E1 e E2</b>	479A (2009)	RB931611	RB99386
<b>E1 e E2</b>	538A (2009)	RB865152	RB92579
<b>E1</b>	589 (2009)	RB845231	H64-1881
<b>E1</b>	34 (2009)	RB805013	F150
<b>E1</b>	35 (2009)	RB971747	RB805013

A condução dos experimentos foi em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ . Foi determinado como padrão a utilização de 150 mg de espiguetas dos cruzamentos, conforme o protocolo estabelecido no Capítulo 1. As espiguetas foram distribuídas homogeneamente em  $650 \text{ cm}^3$  do substrato

Plantmax®, acondicionado em bandejas Sanpack® S-94, com capacidade máxima de 1000 ml (cm<sup>3</sup>), representando a unidade experimental.

O delineamento foi inteiramente casualizado com quatro repetições e dois tratamentos, um tratamento inoculado com o mix da Embrapa (Tabela 15) turfa (dose de 1,6% - 50 g de inoculante para 3 kg de Plantmax®), e um tratamento controle sem inoculação, em fatorial 2 x 5 (E1) e 2 x 2 (E2). Cada experimento foi analisado separadamente pelo teste F, e utilizado o teste Tukey de comparação de médias a 5% de probabilidade. O programa estatístico utilizado foi o SISVAR.

No E1, as avaliações ocorreram diariamente durante os 14 dias após a semeadura (DAS), para o parâmetro Índice de Velocidade de Germinação (IVG) (Maguire, 1962). Foi avaliada a média do tamanho das plântulas (cm) aos 15 DAS por parcela, stand de plântulas aos 15 e 30 DAS e taxa de crescimento da população (%) dos 15 aos 30 DAS, calculada por:

$$\left( \frac{\text{n}^\circ \text{ de plântulas aos 30 DAS} - \text{n}^\circ \text{ de plântulas aos 15 DAS}}{\text{n}^\circ \text{ de plântulas aos 15 DAS}} \right) \times 100.$$

Outro parâmetro avaliado foi a estratificação do tamanho de plântulas (cm) aos 15 DAS, em porcentagem do número de plântulas menores ou iguais a 1 cm, porcentagem do número de plântulas entre 1 e 2 cm e porcentagem de plântulas maiores ou iguais a 2 cm. No E2 foram avaliados tamanho de plântulas (cm) e tamanho de raízes (cm) aos 30 DAS.

**TABELA 15. MIX DA EMBRAPA, COM O NOME CIENTÍFICO E A ESTIRPE CORRESPONDENTE DAS BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS.**

<b>Nome científico</b>	<b>Estirpe</b>
<i>Azospirillum amazonense</i>	CBAmC
<i>Burkholderia tropica</i>	Ppe8
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	HRC54
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	HCc103
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	PAL5

## 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### EXPERIMENTO 1 (E1)

No experimento 1 (E1), foram avaliadas as cinco famílias e dois tratamentos (com e sem inoculação). Na tabela 16 está demonstrada que não houve resposta significativa para tratamentos no parâmetro crescimento da população.

Conforme a tabela 17, para os parâmetros estande de plântulas aos 15 DAS e 30 DAS, houve um comportamento semelhante das famílias nos diferentes tratamentos. De modo geral o tratamento com o inoculante da Embrapa aumentou o número de plântulas em todas as famílias, exceto a família 34, da qual não apresentou diferença estatística. A família 479A apresentou o maior número médio de plântulas germinadas em ambos os tratamentos. O aumento no estande de plântulas no tratamento inoculado pode estar atrelado à produção de reguladores de crescimento pelas bactérias, tal como a giberelina.

Kang *et al.* (2010), verificaram a produção de giberelinas (ácido giberélico) pelo gênero *Burkholderia*. O ácido giberélico promove a síntese da enzima alfa amilase na camada de aleurona, o que desencadeia a liberação de energia estimulando a germinação das plântulas, antes da perda de viabilidade das mesmas (Vieira *et al.*, 1998; Taiz & Zeiger, 2004).

A família que apresentou o menor número de plântulas e não apresentou crescimento da população foi a família 34. Nesse caso, onde não houve aparente promoção no crescimento de plântulas, alguns fatores podem estar contribuindo para tal fato, bem como a suscetibilidade a patógenos e doenças (Martins, 2006; Caieiro, 2008), as bactérias podem ter causado efeito negativo na família, ou ainda houve efeito das características genéticas da próprias família, apresentando uma baixa germinação (Cabral, 2007). Tais fatores podem ter inibido a germinação das cariopses ou ter relação com a mortalidade prematura das plântulas.

TABELA 16. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS FAMÍLIAS 34, 35, 589, 538A E 479A, COM OS TRATAMENTOS MIX EMBRAPA (INOCULAÇÃO COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS) E CONTROLE (SEM INOCULAÇÃO), PARA OS PARÂMETROS AVALIADOS ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG), ESTANDE DE PLÂNTULAS (N15) 15 DIAS APÓS A SEMEADURA (DAS) E 30 DAS (N30), CRESCIMENTO DA POPULAÇÃO (%) DOS 15 DAS AOS 30 DAS (CP) E TAMANHO DE PLÂNTULAS AOS 15 DAS (TP15).

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio				
		IVG	N15	N30	CP	TP15
Família (F)	4	300,42 **	1292,46 **	5317,72 **	95702,89 **	1,67 **
Tratamento (T)	1	48,82 **	330,62 **	688,90 **	149,34 n.s.	0,13 **
F x T	4	15,31 **	54,31 **	75,52 **	357,94 **	0,03 *
Erro Experimental	30	0,24	1,34	4,13	60,31	0,01
Coeficiente de Variação (%)		9,42	8,73	8,15	10,52	10,90

n.s. Não significativo

\*\* Significativo a 1%

\*Significativo a 5%

TABELA 17. MÉDIA DO NÚMERO DE PLÂNTULAS (ESTANDE) 15 DIAS APÓS A SEMEADURA (DAS) E 30 DAS, E CRESCIMENTO DA POPULAÇÃO (%) DOS 15 DAS AOS 30 DAS, NAS FAMÍLIAS 34, 35, 589, 538A E 479A, PARA OS TRATAMENTOS COM INOCULAÇÃO (EMBRAPA) E SEM INOCULAÇÃO (CONTROLE).

Estande de plântulas aos 15 DAS					
Tratamentos	Famílias				
	34	35	589	538A	479A
Embrapa	3,50 aD	9,50 aC	11,75 aBC	13,50 aB	42,50 aA
Controle	2,25 aD	5,75 bC	5,50 bC	10,50 bB	28,00 bA
Estande de plântulas aos 30 DAS					
Tratamentos	Famílias				
	34	35	589	538A	479A
Embrapa	3,50 aD	11,00 aC	12,00 aC	49,50 aB	69,50 aA
Controle	1,75 aD	6,25 bC	6,25 bC	37,00 bB	52,75 bA
Crescimento da população (%) dos 15 aos 30 DAS					
Tratamentos	Famílias				
	34	35	589	538A	479A
Embrapa	0,00 aD	17,01 aC	9,66 aC	268,94 aA	63,77 bB
Controle	0,00 aD	20,00 aC	15,00 aC	255,83 bA	87,88 aB

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

A família que obteve o maior crescimento da população foi a 538A, da qual mais que duplicou a sua população, inclusive com um aumento no tratamento inoculado. As famílias 35 e 589 também tiveram um aumento, no entanto sem diferença entre tratamentos. A família 479A seguiu a mesma tendência em aumentar a sua população, porém o tratamento inoculado obteve um menor crescimento em relação ao tratamento controle (Tabela 17).

O parâmetro IVG foi utilizado por Cabral (2007) e Silva *et al.* (2010) na avaliação dos cruzamentos de cana-de-açúcar. No presente trabalho, a família que apresentou o melhor vigor de plântulas foi a família 479A, seguida das famílias 538A, 589, 35 e a família 34 que apresentou o menor vigor dentre todas as estudadas e foi a única que não apresentou diferença no tratamento com inoculação das bactérias, em todos os parâmetros estudados anteriormente. Nas famílias 35, 538A e 479A, houve um aumento no vigor de plântulas no tratamento com as bactérias diazotróficas (Tabela 18). A causa no aumento da velocidade de germinação pode estar interligada a produção de reguladores vegetais pelas bactérias.

TABELA 18. ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DAS FAMÍLIAS 34, 35, 589, 538A E 479A, COM OS TRATAMENTOS COM INOCULAÇÃO (EMBRAPA) E SEM INOCULAÇÃO (CONTROLE).

Tratamentos	Famílias				
	34	35	589	538A	479A
<b>Embrapa</b>	0,37 aD	1,82 aC	1,22 aCD	10,26 aB	17,64 aA
<b>Controle</b>	0,20 aC	1,11 bC	0,91 aC	7,05 bB	10,99 bA

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

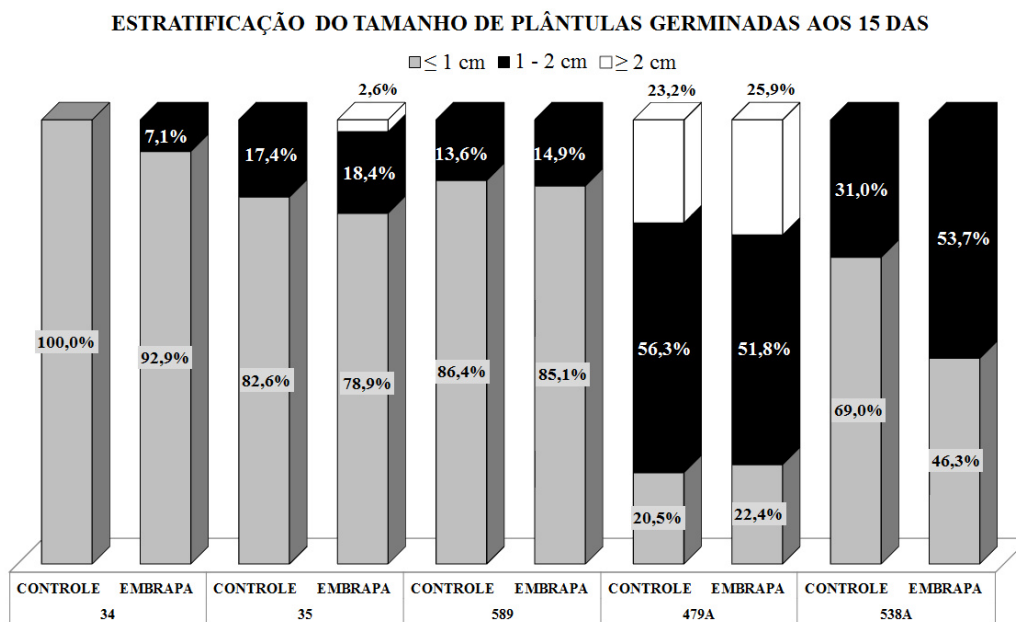
Aos 15 DAS as plântulas dos tratamentos inoculados apresentaram médias maiores que os tratamentos sem inoculação. O tamanho das plântulas nas famílias 35 e 538A no tratamento inoculado foram estatisticamente superiores ao tratamento sem inoculação. Para as outras famílias não houve diferença estatística (Tabela 19).

Conforme a figura 5, onde foram estratificados o número de plântulas em faixas de tamanho de plântulas, a família 479A foi a que apresentou a maior porcentagem de plântulas entre 1 e 2 cm e maiores que 2 cm, houve também uma tendência semelhante dos estratos nos dois tratamentos. A família 538A também apresentou uma grande quantidade de plântulas acima de 1 cm, e ainda apresentou em torno de 15 pontos percentuais a mais no tratamento inoculado que no controle para a quantidade de plântulas entre 1 e 2 cm.

As famílias 35 e 589 tiveram um comportamento parecido, em torno de 80% das plântulas menores ou iguais a 1 cm, em torno de 15% entre 1 e 2 cm, e a

família 35 foi a única que apresentou 2,6% de plântulas acima de 2 cm, no tratamento Embrapa. A família 34 apresentou 100% das plântulas menores que 1 cm no tratamento sem inoculação e apenas 7,1% entre 1 e 2 cm no tratamento com inoculação (Figura 5).

As bactérias diazotróficas produzem reguladores vegetais como as auxinas (Bashan & Holguin, 1997), estas atuam no alongamento das raízes, aumentando a área de absorção das mesmas (Taiz & Zeiger, 2004), conseqüentemente nutrindo melhor a planta como um todo, e podendo resultar na promoção da parte aérea. Outra possível causa pode ser a própria fixação biológica do nitrogênio (FBN) (Sevilla *et al.*, 2001), sendo o nitrogênio um elemento importante no desenvolvimento vegetal (Paul & Clark, 1989). García *et al.* (2010), identificaram cepas de *Azospirillum* spp. produtoras de ácido indol-acético (AIA) (auxina) e cepas associadas também a melhor fixação de nitrogênio, promovendo o crescimento em arroz.



**FIGURA 5. COMPARAÇÃO DOS TRATAMENTOS INOCULADO COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS (EMBRAPA) E NÃO INOCULADO (CONTROLE), PARA O PARÂMETRO TAMANHO DE PLÂNTULAS AOS 15 DIAS APÓS A SEMEADURA, DIVIDIDO EM TRÊS ESTRATOS, PORCENTAGEM DO NÚMERO DE PLÂNTULAS MENORES OU IGUAIS A 1 cm ( $\leq 1$  cm), PORCENTAGEM DO NÚMERO DE PLÂNTULAS ENTRE 1 E 2 cm (1-2 cm) E PORCENTAGEM DO NÚMERO DE PLÂNTULAS MAIORES OU IGUAIS A 2 cm ( $\geq 2$  cm) DAS FAMÍLIAS 34, 35, 589, 479A E 538A.**

TABELA 19. MÉDIA DO TAMANHO DE PLÂNTULAS (cm) 15 DIAS APÓS A SEMEADURA, DAS FAMÍLIAS 34, 35, 589, 538A E 479A, COM OS TRATAMENTOS INOCULADOS (EMBRAPA) E SEM INOCULAÇÃO (CONTROLE).

Tratamentos	Famílias				
	34	35	589	538A	479A
<b>Embrapa</b>	0,56 aD	0,88 aC	0,68 aCD	1,17 aB	1,71 aA
<b>Controle</b>	0,55 aC	0,63 bC	0,64 aC	0,92 bB	1,68 aA

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

## EXPERIMENTO 2 (E2)

Devido a grande quantidade de material e a responsividade das famílias 479A e 538A, estas foram levadas a um novo experimento sob as mesmas condições. Na tabela 20, para os parâmetros avaliados, não houve diferença na interação famílias e tratamentos. A família 479A apresentou maiores médias para tamanho de raízes e parte aérea (Tabela 21).

Nas duas famílias e nos parâmetros estudados, o tratamento com o inoculante da Embrapa seguiu a mesma tendência e foi superior ao tratamento Controle, para tanto houve promoção no crescimento das plantas avaliadas, e portanto benefício da inoculação (Tabela 21). As alterações morfológicas e fisiológicas, aumentando o tamanho de raízes (indiretamente beneficiando a absorção de nutrientes) e plântulas nos tratamentos inoculados, foi também evidenciado no trabalho de Silva *et al.* (2009), onde as mesmas estirpes de bactérias do mix da Embrapa – em veículo diferente do turfoso – promoveram o desenvolvimento de plantas de duas cultivares.

TABELA 20. ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS PARÂMETROS TAMANHO DE PLÂNTULAS (cm) (TP) E TAMANHO DE RAÍZES (cm) (TR) 30 DIAS APÓS A SEMEADURA, COM OS TRATAMENTOS INOCULADO (EMBRAPA) E NÃO INOCULADO (CONTROLE), DAS FAMÍLIAS 538A E 479A.

Fontes de Variação (F.V.)	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	
		TP	TR
<b>Família (Fam.)</b>	<b>1</b>	3,04 **	1,37 **
<b>Tratamento (Trat.)</b>	<b>1</b>	3,13 **	0,54 **
<b>Fam. x Trat.</b>	<b>1</b>	0,04 n.s.	0,02 n.s.
<b>Erro Experimental</b>	<b>12</b>	0,01	0,03
<b>Coeficiente de Variação (%)</b>		<b>4,35</b>	<b>7,27</b>

n.s. não significativo

\*\* Significativo a 1%



TABELA 21. MÉDIAS DO TAMANHO DE PLÂNTULAS (cm) (TP) E TAMANHO DE RAÍZES (cm) (TR) AOS 30 DIAS APÓS A SEMEADURA, DAS FAMÍLIAS (FAM.) 538A E 479A COM OS TRATAMENTOS (TRAT.) SEM INOCULAÇÃO (CONTROLE) E COM INOCULAÇÃO (EMBRAPA).

Tratamentos	TP			TR		
	538A	479A	F.V. Trat.	538A	479A	F.V. Trat.
<b>Embrapa</b>	2,56	3,53	3,04 a	2,22	2,73	2,48 a
<b>Controle</b>	1,77	2,54	2,16 b	1,78	2,43	2,11 b
<b>F.V. Fam.</b>	2,16 B	3,04 A		1,99 B	2,58 A	

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

## 5.4 CONCLUSÕES

- O mix de bactérias diazotróficas promoveu o crescimento de plantas nas famílias estudadas. Apenas a família 34 não apresentou resultados na inoculação para os parâmetros estimados.
- A inoculação beneficiou no aumento do vigor principalmente nos cruzamentos 35, 538A e 479A. Também nos tratamentos inoculados houve incremento na população das famílias 35, 589, 538A e 479A.
- Quanto ao desenvolvimento de raízes e parte aérea o mix atuou positivamente nas famílias estudadas.
- De forma geral a família 538A foi a que melhor respondeu para os parâmetros estimados.

## 5.5 REFERÊNCIAS

- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Azospirillum-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.103-121, 1997.
- BARBOSA, M. H. P.; SILVEIRA, L. C. I.. Melhoramento Genético e Recomendação de Cultivares. In: SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. **Cana-de-açúcar: Bioenergia, Açúcar e Álcool – Tecnologia e Perspectivas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2010. p. p.313-331.
- CABRAL, F. F. **Qualidade fisiológica e armazenamento de sementes de cana-de-açúcar provenientes de diferentes cruzamentos**. 62 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2007.
- CAIEIRO J. T. **Avaliação da qualidade de sementes (cariopses) de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), como suporte ao melhoramento genético**. 55 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- ESQUIVEL-COTE, R; RAMÍREZ-GAMA, R. M.; TSUZUKI-REYES, G.; OROZCO-SEGOVIA, A.; HUANTE, P. *Azospirillum lipoferum* strain AZm5 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase improves early growth of tomato seedlings under nitrogen deficiency. **Plant Soil**, v.337, p.65-75, 2010.
- GARCÍA, F.; MUÑOZ, H.; CARREÑO, C.; MENDOZA, G. Caracterización de cepas nativas de *Azospirillum spp.* y su efecto en el desarrollo de *Oryza sativa* L. “arroz” en Lambayeque. **Scientia Agropecuaria**, v.1, p.107-116, 2010.
- GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, p. 395-412, 2005.
- HUNGRIA M., 2011. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011.
- IFA. **Mineral Fertilizer Use and the Environment** by K. F. Isherwood **International Fertilizer Industry Association**. Revised Edition, Paris: IFA, 2000.
- KANG, S.; HAMAYUN, M.; JOO, G.; KHAN, A. L.; KIMA, Y.; KIMC, S.; JEONG, H.; LEE, I. Effect of Burkholderia sp. KCTC 11096BP on some physiochemical attributes of cucumber. **European Journal of Soil Biology**, v.46, p.264-268, 2010.
- LANDELL, M. G. A.; BRESSIANI, J. A. Melhoramento genético, caracterização e manejo varietal. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2008. p. p.101-155.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination – and in selection for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.2, p.176-177, 1962.

MARTINS, T. D. **Fungos associados às sementes de cana-de-açúcar (cariopses) no Brasil: identificação, patogenicidade e controle**. 102 f. Dissertação (Mestrado). Esalq/USP, Piracicaba, 2006.

PAUL, E. A.; CLARK, F. E. **Soil Microbiology and Biochemistry**. 1 ed. California: Academic Press, 1989.

SEVILLA, M.; BURRIS, R. H.; GUNAPALA, N.; KENNEDY, C. Comparison of Benefit to Sugarcane Plant Growth and  $^{15}\text{N}_2$  Incorporation Following Inoculation of Sterile Plants with *Acetobacter diazotrophicus* Wild-Type and  $\text{Nif}^-$  Mutant Strains. **Molecular plant-microbe interactions**, v.14, n.3, p.358-366, 2001.

SHULTZ, N.; MORAIS, R. F.; SILVA, J. A.; BAPTISTA, R. B.; OLIVEIRA, R. P.; LEITE, J. M.; PEREIRA, W.; CARNEIRO JR., JOSIL DE BARROS; ALVES, B. J. R.; BALDANI, J. I.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Avaliação agronômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.2, p.261-268, 2012.

SILVA, M. A.; MARINA, M. C.; PERECIN, D.; BRESSIANI, J. A. Comparação de ambientes na germinação de cariopses de cana-de-açúcar. **Ciência e Agrotecnologia**, v.34, Edição Especial, p.1604-1609, 2010.

SILVA, M. F.; OLIVEIRA, P. J.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; REIS, V. M. Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura da cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.11, p.1437-1443, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

VIEIRA, H. D., SILVA, R. F., BARROS, S. R. Efeito de substâncias reguladoras de crescimento sobre a germinação de sementes de braquiário cv marandu. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.10, n.2, p.143-148, 1998.

XAVIER, R. P. **Contribuição da fixação biológica de nitrogênio na produção sustentável da cultura de cana-de-açúcar**. 71 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

## 6 CONCLUSÕES GERAIS

O protocolo de inoculação de bactérias diazotróficas é uma importante ferramenta para o melhoramento de plantas, visando estudos na busca de genitores e genótipos responsivos, podendo ser criado, por exemplo, um banco de dados para os cruzamentos de interesse.

Para uma maior padronização, mesmo havendo diferenças significativas nas germinações dos diferentes lotes, foi utilizada a densidade de 150 mg de espiguetas por parcela, para um melhor aproveitamento dos testes de inoculação. O substrato escolhido foi o Plantmax®, que oferecia uma boa condição de desenvolvimento de plântulas, e uma condição desejável para a interação com bactérias. Fica recomendado autoclavar o substrato, pois o uso dessa prática pode evitar a interferência de outros fatores. Para o inoculante mix da Embrapa recomenda-se a aplicação do inoculante em veículo turfoso, sem diluições, na dose de 1,6%.

Nas famílias em que foram testados os inoculantes IC-26, Triazo e Embrapa, o inoculante da Embrapa foi o que apresentou os melhores resultados. Vale ressaltar que o inoculante da Embrapa é o único dos três que foi desenvolvido especificamente para cana-de-açúcar. Também foi possível identificar as famílias mais responsivas ao inoculante da Embrapa, demonstrando a interação com o inoculante. As famílias 479A e 538A foram as que apresentaram os melhores resultados quanto à inoculação. As famílias 35 e 589 também apresentaram resultados satisfatórios quanto a inoculação.

Embora tenha sido definido um padrão de inoculação no presente estudo, e demonstrada a responsividade de algumas famílias, ainda são necessários testes com outros inoculantes, visando à associação com a cana-de-açúcar.